



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JEANNE CRISTINA LAPENDA LINS CANTALICE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E
EFEITOS GENOTÓXICOS DA PRODIGIOSINA PRODUZIDA POR
Serratia marcescens UFPEDA 398**

RECIFE
2014

JEANNE CRISTINA LAPENDA LINS CANTALICE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E
EFEITOS GENOTÓXICOS DA PRODIGIOSINA PRODUZIDA POR
Serratia marcescens UFPEDA 398**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mônica Lúcia Adam

RECIFE
2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Cantalice, Jeanne Cristina Lapenda Lins

Avaliação da atividade antimicrobiana, citotóxica e efeitos genotóxicos da prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* UFPEDA 398 / Jeanne Cristina Lapenda Lins Cantalice. ã Recife: O Autor, 2014.

216 folhas: il.

Orientadores: Silene Carneiro Nascimento, Mônica Lúcia Adam

Tese (doutorado) ã Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Bactérias 2. Produtos naturais I. Nascimento, Sielene Carneiro (orient.) II. Adam, Mônica Lúcia (coorient.) III. Título.

579.33

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-146

JEANNE CRISTINA LAPENDA LINS CANTALICE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E
EFEITOS GENOTÓXICOS DA PRODIGIOSINA PRODUZIDA POR
Serratia marcescens UFPEDA 398**

Tese submetida à coordenação do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas outorgado pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 05 / 06 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Profa. Dra. Ana Luiza Munccillo Baisch
Universidade Federal do Rio Grande- UFRG

Profa. Dra. Mônica Lúcia Adam
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE
Centro Acadêmico de Vitória-CAV

Dai-me Senhor, a perseverança das ondas do mar, que fazem de cada recuo um ponto de partida para um novo avanço.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus pela concessão de vida, pelas bênçãos e vitórias derramadas sobre mim e em especial, pela concessão deste título de Doutora em Ciências Biológicas. Este representa mais do que uma nivelção e sim uma concretização de um sonho que tiverá ha muito tempo atrás em 2002, período em que ingressava na Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. Ainda que principiante tinha certeza que um dia me tornaria alguém diferente e que minha jornada não terminaria com a colação de grau e sim com conquistas maiores como a que estou gozando agora. Mas nessa longa jornada algumas pessoas abençoadas por Deus foram diferenciais na minha vida, pois compartilharam do meu sonho como os meus pais, Gilson Lins e Tereza Lapenda, que com todo seu amor me ensinaram a ser uma pessoa de carácter e a valorizar os princípios de vida hoje tão esquecidos como respeito ao próximo, lealdade, sinceridade, ética e profissionalismo. Obrigada papai e mamãe! Vocês são a razão da minha existência! Amo muito vocês! Sou e serei eternamente grata a vocês e prometo que continuarei na luta e não desistirei. Continuarei lutando para retribuir o melhor conforto, proteção e saúde que vocês merecem.

Neste ciclo de vida apareceram pessoas que ao longo do tempo foram se tornando importantes em minha vida e uma delas é o meu esposo, Eduardo Henrique Cantalice da Cunha. Querido, obrigada também por todo amor e paciência comigo mesmo quando você necessitava da minha atenção e inevitavelmente estava totalmente voltada para o meu trabalho esquecendo-me um pouco de você. Obrigada pelo total apoio e compreensão! Obrigada por também utilizar de seus conhecimentos na tecnologia da informação em meu favor.

Em especial e com muito carinho, agradeço a minha querida orientadora, Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento que tem sido um grande exemplo de vida. Com seu jeitinho simples de ser tem cativado grande afeição de todos que convivem com ela. Gostaria de destacar também que sou grata por todos os ensinamentos e orientações que foram de fundamental importância para que pudesse chegar até aqui. Obrigada por todos esses anos de ensinamentos. Isso fez a total diferença em minha vida.

Com muito carinho agradeço também a professora e co-orientadora doutora Mônica Lúcia Adam pelas orientações e pela total contribuição que foram de fundamental importância para a construção deste trabalho. Agradeço pelo companherismo, pelas oportunidades concebidas e pela total credibilidade em mim depositada.

Em especial, agradeço a Profa. Dra. Maria Eliane Bezerra de Melo pela grande colaboração com a minha pesquisa através de seus conhecimentos em genotoxicidade que foram

indispensáveis. A todos que fazem o Laboratório de mutagênese do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Obrigada pelo carinho e pelo apoio!

Agradeço também a professora Dra. Glaucia Manoella de Souza Lima pelas orientações, como também as professoras Dra. Norma Gusmão, Kêsia Xistos, Magali Araújo, que não mediram esforços, contribuindo de forma direta na conclusão deste trabalho. Estas professoras cederam os espaços dos seus respectivos laboratórios para que eu pudesse também utilizá-lo em minhas pesquisas.

A todos que representam o Departamento de Antibióticos por onde também tive livre acesso aos respectivos laboratórios o meu enorme carinho. Ao Laboratório de Cultura e Coleção de Micro-organismos, em especial a técnica de laboratório Fátima pelo apoio nas manutenções das linhagens bacterianas que utilizei em minhas pesquisas e pelo respeito e carinho também.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES, os meus sinceros agradecimentos pelas concessões de bolsas que custearão todos os gastos com a minha pesquisa.

Agradeço também aos amigos queridos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial- LAMAI, ao Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos- LAFEM que compartilharam dos meus sofrimentos e lutas. Lembro-me dos momentos de pura descontração, entrosamento, intimidade e respeito que ao longo de muita convivência aprendemos a construir bases sólidas de amizades e que hoje tem sido um referencial em nosso departamento. Gostaria de citar todos os meus queridos amigos do LAMAI: Flávia Arruda, Pêrsio Alexandre, Erick Jones, Evelyne Solidonio, Maria Claudia Vicalvi, Glêzia Renata, Robson, Talyce, Nelânia Baptista, Mayra Judite, Carla Maciel, Rodrigo Fragoso, Rita, Edélvio, Luis Claudio, Igor. Em fim, sou muito grata a todos que contribuíram de forma direta e indireta na concretização deste sonho.

“Onde estou não é quem eu sou, pois quem Eu sou é maior do que onde estou” (Pr. Samuel Chand)

***“Por que Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;
glória pois a Ele eternamente” (Romanos 11: 36).***

RESUMO

A prodigiosina, pigmento vermelho natural, é um alcaloide produzido por *Serratia marcescens* e pertencente à família das prodigininas cujos pigmentos apresentam em sua estrutura química três anéis cíclicos pirrólicos. Este pigmento tem despertado, nos últimos anos, um crescente interesse das diversas áreas como médica, farmacêutica e industrial pela inúmeras atividades biológicas descritas como antimicrobianas, antimalárica e antitumoral. Este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da prodigiosina frente a micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos patogênicos, avaliar a atividade citotóxica do pigmento em linhagens de células tumorais e seus os efeitos genotóxicos. O pigmento vermelho foi isolado e identificado a partir da biomassa de *Serratia marcescens* UFPEDA 398 cujas as frações foram separadas e purificadas por cromatografia em coluna TLC, identificadas por cromatografia em camada delgada CCD e caracterizadas por cromatografia de massa GCMS sendo em seguida os dados obtidos comparados com a biblioteca computadorizada de valores em massa / elétrons (m/e) onde o pigmento vermelho caracterizado correspondeu a prodigiosina com máxima absorção em 534 nm e peso molecular de 323. Para avaliar a atividade antimicrobiana da prodigiosina foram realizados testes de difusão em discos frente aos micro-organismos *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07, *Acinetobacter* sp UFPEDA 994 e a determinação da concentração mínima inibitória e mínima bactericida (CMI e CMB) frente a 20 linhagens de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (ORSA). Os antibióticos padrões utilizados nos testes em discos foram ampicilina, cloranfenicol, gentamicina (10 µg). Os testes de difusão em discos demonstraram significativos halos inibitórios para *Staphylococcus aureus* (35 ± 0.6), *Enterococcus faecalis* (22 ± 1.0) e *Streptococcus pyogenes* (14 ± 0.6) sugerindo sensibilidade destes micro-organismos a prodigiosina. Contudo, o mesmo resultado não foi observado para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* não sendo observados formação de halos inibitórios significativos e portanto, sugerindo resistência dos mesmos ao pigmento. As CMI's encontradas para *Staphylococcus aureus* variaram de 1 a 4 µg / mL, enquanto as CMB's entre 2 e 16 µg / mL. Estes resultados demonstram ser bastante promissores quando comparados com o antibiótico padrão oxacilina (CMI 128 µg / mL e CMB ≥ 128 µg / mL). Os efeitos citotóxicos da prodigiosina frente as linhagens tumorais NCHI 292, Hep 2, MCF 7 e HL 60 foram bastante significativos destacando maior efeito citotóxico para linhagem tumoral Hep 2 (IC_{50} 3,4 µg / mL). Contudo a linhagem MCF 7 apresentou leve resistência ao pigmento (IC_{50} 5,1 µg / mL). Foi observado também que o pigmento induziu apoptose para as linhagens tumorais em 90%. Foram observados para a prodigiosina efeitos genotóxicos estatisticamente significativos em células mononucleadas de sangue periférico humano como também em linhagens tumorais demonstrando que o pigmento age resultando em danificação genômica com efeito genotóxico superior a doxorrubicina e que não apresenta alvo de ação específico. Neste sentido, com base nos dados encontrados neste trabalho a *Serratia marcescens* UFPEDA 398 apresentou promissora atividade antimicrobiana, citotoxicidade e genotóxica para linhagens de células tumorais e ainda, efeitos genotóxicos em células normais demonstrando a sua ação não seletiva. Desta forma o pigmento prodigiosina ainda não pode ser empregado nas terapias antineoplásicas, uma vez que por apresentar alvo de ação não específico induz graves danificações as células normais que podem causar morte celular ou mutações que são as principais causas da tumorigênese.

Palavras-chaves: Produtos naturais, Resistência bacteriana, Citotoxicidade, Genotoxicidade.

ABSTRACT

The prodigiosin natural red pigment, is an alkaloid produced by *Serratia marcescens* UFPEDA 398 and belongs to the family of prodigininas whose pigments present in their chemical structure three cyclic rings pyrrol. This pigment has attracted in recent years, a growing interest from various fields like medical, pharmaceutical and industrial by several biological activities described as antimicrobial, antimalarial, and foremost, antitumor. This work aims to evaluate the antimicrobial activity of prodigiosin against micro-organisms Gram-positive and Gram-negative pathogens, evaluate the cytotoxic activity of the pigment in tumor cell lines and their genotoxic effects. The red pigment was isolated from the biomass of *S. marcescens* UFPEDA 398 whose fractions were separated and purified by column chromatography on TLC, identified by thin layer chromatography TLC and characterized by GCMS gas chromatography-mass being then compared with the data obtained from the library values computed in mass / charge (m/z) where red pigment corresponded wherein the prodigiosin with maximum absorption at 534 nm and a molecular weight of 323. To evaluate the antimicrobial activity of prodigiosin diffusion tests were performed on disks against micro-organisms *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07, *Acinetobacter* sp UFPEDA 994 and determination minimum bactericidal (CMI and CMB) against 20 strains of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) minimum inhibitory concentration and . Antibiotics used in the test patterns on disks were ampicillin, chloramphenicol, gentamicin (10 mg). The disc diffusion tests demonstrated significant inhibitory halos for *Staphylococcus aureus* (35 ± 0.6), *Enterococcus faecalis* (22 ± 1.0) and *Streptococcus pyogenes* (14 ± 0.6) suggesting sensitivity of these micro-organisms prodigiosin. However, the same effect was not observed in *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* sp are not significant inhibiting formation of halos observed and thus suggesting the strength of the same pigment. The MIC's found in *Staphylococcus aureus* ranged from 1 for 4 $\mu\text{g/mL}$, while the WBC's from 2 for 16 $\mu\text{g/mL}$. These results demonstrate be very promising compared to the standard antibiotic oxacillin (MIC 128 $\mu\text{g/mL}$ and CMB $\geq 128 \mu\text{g/mL}$). The cytotoxic effects of prodigiosin the front NCHI 292 tumor lines, Hep 2, MCF 7, HL 60 and non malignant cell BGIMK were highly significant highlighting the cytotoxic effect on tumor cell line HEp-2 (IC_{50} 3.4 $\mu\text{g/mL}$). However lineage MCF 7 showed slight resistance to the pigment (IC_{50} 5.1 $\mu\text{g/mL}$). It was also observed that the pigment induced apoptosis in the tumor cell lines by 80%. Prodigiosin were observed for statistically significant mononucleated cells in human peripheral blood as well as in tumor lines demonstrating that the pigment resulting in genomic acts to genotoxic damage adoxorubicina upper and does not have target specific action genotoxic effects. The *Serratia marcescens* UFPEDA 398 prodigiosin produced showed promising antimicrobial, cytotoxic and genotoxic activity in tumor cell lines and also genotoxic effects in normal cells demonstrating its non-selective action. Thus the pigment prodigiosin still can not be used in antineoplastic therapies once by presenting target non-specific action induces severe damage normal cells that can cause cell death or mutations that are the main causes of tumorigenesis.

Keywords: Natural products, Bacterial resistance, Cytotoxicity, Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da prodigiosina (Elahian et al., 2013).....	23
Figura 2. Biossíntese e regulação gênica da prodigiosina (Harris et al., 2004).....	24
Figura 3. Transformação da célula normal em célula neoplásica (Alemeida et al., 2005).....	29
Figura 4. Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2012, na população brasileira (Inca, 2012).....	31
Figura 5. Estágios da formação do câncer (Inca, 2003).....	32
Figura 6. Influência de agentes genotóxicos indutores da formação de micronúcleo (Ksaprzak et al., 1991).....	34
Figura 7. Mecanismo de formação dos micronúcleos MN (Fenech et al, 2003).....	37
Figura 8. Célula binucleada com micronúcleo (MN) evidente (modificado de Pacheco e Hackel, 2002).....	38
Figura 9. Ensaio cometa alcalino (Modificado de Aucicek et al., 2008).....	39
Figura 10. Ensaio cometa: classificação de dano genômico (Sight et al., 1988)	40

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Prodigiosina produzida por <i>Serratia marcescens</i> em meio Ágar Manitol em 48 horas de cultivo.....	59
Figura 2. Espectrofotometria UV-vis da Prodigiosina com absorbância máxima em 534,40 nm.....	60
Figura 3. Espectrofotometria de massa GCMS da Prodigiosina produzida por <i>S. marcescens</i>	60
Figura 4. Espectrometria de massa da fração roxa (monopirrol) produzida por <i>S. marcescens</i> UFPEDA 398.....	61
Figura 5. Atividade antimicrobiana da Prodigiosina e da FR-fração roxa em 24 horas de cultivo.....	62
Figura 6. Determinação da CMB para Prodigiosina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 72 resistente oxacilina.....	63

CAPÍTULO 2

Figura 1. Estruturas químicas dos pigmentos vermelhos pertencentes a família das prodigininas.....	76
Figura 2. Indução de apoptose e necrose para a linhagem Hep-2 após exposição de 48 horas a prodigiosina (IC50 3,4 µg/ mL).....	82
Figura 3. Indução de apoptose e necrose para a linhagem HL 60 após exposição de 48 horas a prodigiosina (IC50 3,4 µg/ mL).....	83
Figura 4. Indução de apoptose e necrose para a linhagem NCIH 279 após exposição de 48 horas a prodigiosina (IC50 3,4 µg/ mL).....	84
Figura 5. Indução de apoptose e necrose para a linhagem Hep-2 após exposição de 72 horas a prodigiosina (IC50 3,4 µg/ mL).....	86
Figura 6. Indução de apoptose e necrose para a linhagem NCIH 279 após exposição de 72 horas a prodigiosina (IC50 3,4 µg/ mL).....	87

CAPÍTULO 3

Figura 1. Presença de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico humano após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de prodigiosina. A1-A3 Controle negativo (células com ausência de MN); B1-B3; Presença de MN (concentrações de 0,5 a 1,0 µM/ mL); C1-C3 Presença de MN (concentração de 10 µM/ mL); D1-D3 Presença de MN (concentração de 100 µM/ mL).....	103
Figura 2. Linfócito de sangue periférico humano apoptótico após 24 horas de exposição observado na concentração de 100 µM/ mL	103
Figura 3. Análise de Kruskal Wallis para as comparações entre as frequências de células micronucleadas nas diferentes concentrações de prodigiosina e tratamentos	104

Figura 4. ANOVA para as comparações entre os índices de danos nas diferentes concentrações de prodigiosina	106
Figura 5. ANOVA para as comparações entre os sexos quanto às frequências de células micronucleadas nas diferentes concentrações de prodigiosina	107
Figura 6. ANOVA para as comparações entre os sexos quanto aos índices de danos nas diferentes concentrações de prodigiosina	108
Figura 7. Danos genômicos observados em células mononucleadas normais de sangue periférico humano expostas as diferentes concentrações de prodigiosina (0,5; 1,0; 10 e 100 $\mu\text{M/mL}$).	

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Micro-organismos empregados no teste de difusão em disco.....	54
Tabela 2. Cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a oxacilina (ORSA) empregadas no teste de sensibilidade antimicrobiana a prodigiosina em 24 horas de cultura.....	55
Tabela 3. Produção de prodigiosina por <i>S. marcescens</i> UFPEDA 398 em meio Ágar Manitol após 48 horas de cultura.....	59
Tabela 4. Atividade antimicrobiana da Prodigiosina, teste de difusão em disco (Kirby-Bauer, 1966).....	62
Tabela 5. Concentração mínima inibitória e bactericida (CMI) e (CMB) da Prodigiosina.....	64

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Mensuração da IC ₅₀ para a prodigiosina frente a linhagens tumorais.....	72
Tabela 2. Indução de apoptose e necrose em linhagens tumorais exposta a prodigiosina (IC ₅₀ 3,4 µg/ mL) após 48 horas.....	75
Tabela 3. Indução de apoptose e necrose em linhagens tumorais exposta a prodigiosina (IC ₅₀ 3,4 µg/ mL) após 72 horas.....	83

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Número e média de células micronucleadas nas diferentes concentrações (µM/ mL) de prodigiosina e doxorubicina.....	103
Tabela 2. Índice de Proporcionalidade das médias de células micronucleadas entre os tratamentos.....	104
Tabela 3. Teste de Tukey (<i>a posteriori</i>) para a comparação das frequências de células micronucleadas entre os diferentes tratamentos e concentrações (µM/ mL) de prodigiosina....	105
Tabela 4. Índices de danos nas diferentes concentrações (µM/ mL) de prodigiosina.....	106
Tabela 5. Teste de Tukey (<i>a posteriori</i>) para a comparação dos índices de danos entre os diferentes tratamentos e concentrações (µM/ mL) de prodigiosina.....	107
Tabela 6. Teste de Tukey (<i>a posteriori</i>) para a comparação entre os sexos em relação às frequências de células micronucleadas e aos índices de danos entre os diferentes tratamentos e concentrações (µM/ mL) de prodigiosina.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS

BL-16	Linhagem de células epiteliais tumorais (melanoma)
CMI	Concentração mínima inibitória
CMB	Concentração mínima bactericida
GCMS	Gas Chromatographie Mass Espectrometry
Huh-7	Linhagem celular tumoral hepática
IC ₅₀	Concentração que mata 50 % da população celular
LM	Agarose LM de baixo ponto de fusão
MAP	2-metil-3-n-amil-pirrol
MBC	4-metoxi-2,2-bipirrol-5-carboxaldeído
MDR	Proteínas canais da membrana plasmática
MN	Micronúcleo
Pig	Grupo de genes para a Prodigiosina
RhoA	Proteínas reguladoras
RhoGTPase	Proteínas reguladoras
UV-vis	Espectrofotometria Ultravioleta Visível
DOX	Doxorrubicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Geral.....	20
2.2	Específicos	20
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1	<i>Serratia marcescens</i> e a prodigiosina	22
3.2	Biossíntese da Prodigiosina.....	24
3.3	Atividade biológica da Prodigiosina	25
3.4	Atividade antimicrobiana da prodigiosina	27
3.5	Câncer: Definições e generalidades.	27
3.6	Epidemiologia do câncer.....	30
3.7	Processos de carcinogênese.....	31
3.8	Terapias antitumorais	33
3.9	Avaliação de mutagenicidade e danos genômicos (Ensaio de genotoxicidade).....	34
3.9.1	Teste de micronúcleo em linfócitos de sangue periférico humano.....	36
3.9.2	Ensaio cometa alcalino (Alkaline comet assay).....	38
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
	<i>Capítulo 1 Atividade antimicrobiana da prodigiosina isolada de Serratia marcescens</i> UFPEDA 398	51
	<i>Capítulo 2 Citotoxicidade da prodigiosina, pigmento natural, isolado de Serratia</i> <i>marcescens</i> UFPEDA 398	73
	<i>Capítulo 3 Evidência de danificação genômica induzida por prodigiosina em células</i> <i>monucleadas normais</i>	99
5.	Conclusão	120
6.	Anexos	123

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A prodigiosina é um pigmento vermelho sintetizado pela Enterobacteria *Serratia marcescens*. Este pigmento é um alcalóide tripirrol de cadeia linear (pirrol, 3-metoxipirrol, 2-metil-amilpirrol), que apresenta em sua estrutura química três anéis pirrólicos denominado tripirrol (CHANG et al., 2011).

S. marcescens é uma cepa que se destaca pelo seu potencial de síntese da prodigiosina. Observa-se que, em meios ricos em fontes de carbonos mais simples como a glicose ou frutose, um máximo rendimento de prodigiosina e ainda, em meios contendo fontes mais complexas como o amido, observa-se também o máximo rendimento deste pigmento. Em adicional, quando em meios ricos em óleos vegetais, como óleo de côco, gergelim, milho, canola dentre outros, também observa-se máxima produção da prodigiosina (CERDEÑO et al., 2001; GIRI et al., 2004; WILLIAMNSON et al., 2006; CHANG et al., 2011).

A prodigiosina pertence à família dos pigmentos vermelhos naturais, denominada prodiginina. Além da prodigiosina outros compostos semelhantes fazem parte desta família de pigmentos naturais, como o undecilprodigiosina e o cicloprodigiosina, contudo destacando-se a prodigiosina por suas atividades biológicas descritas (CLIFT e THOMPSON, 2009).

Este pigmento vermelho tem despertado um crescente interesse ao longo dos últimos cinco anos nas diversas áreas como industrial, ambiental, médica e principalmente, farmacológica, considerando as diferentes atividades biológicas descritas como antibacteriana, antifúngica, antimalárica, algicidas, imunossupressora induzindo apoptose em linfócitos T e B e, mais recentemente, antitumoral, sendo considerado atóxica às células sadias (KALIVODA., 2010).

Observa-se que pacientes com câncer são susceptíveis a infecções reincidentes provocadas por fungos e bactérias resultante da baixa imunidade pós terapia antitumoral. Apesar das descrições científicas quanto às atividades biológicas conferidas a prodigiosina, observa-se que poucos estudos demonstram o potencial antimicrobiano do pigmento. Este fato nos chama a atenção para a investigação desta atividade, uma vez que a resistência microbiana tem aumentado nos últimos anos, onde são observados frequentes casos de infecções hospitalares e surtos alimentares (JONES et al., 2005).

Apesar de serem descritos dados sobre o efeito antitumoral da prodigiosina, estes ainda requerem estudos mais aprofundados para melhor elucidação de tais efeitos. A prodigiosina tem sido alvo de diversas pesquisas sendo descritos efeitos apoptóticos para o pigmento natural e seus análogos frente a linhagens de células tumorais (MONTANER et al., 2005). A prodigiosina produzida por *S. marcescens* induz apoptose em linhagens de células cancerígenas

hematopoiéticas e gastrointestinais sem causar quaisquer efeitos tóxicos às células normais (DIAZ-RUIZ et al., 2001; FENDER et al., 2012). Em adicional, o pigmento apresenta efeitos tóxicos no nível de DNA através da clivagem oxidativa, induzindo a célula a iniciar o processo apoptótico (WILLIAMNISON et al., 2006; SAÉZ; BENNETTE e THOMPSON, 2009). Estes resultados têm corroborado para que a prodigiosina se torne uma nova promessa das indústrias farmacêuticas quanto às terapias antineoplásicas convencionais que, atualmente, utilizam drogas antitumorais cuja ação é inespecífica, induzindo citotoxicidade tanto as células tumorais como também às células sadias.

Neste sentido, este trabalho tem por objetivos avaliar a atividade antimicrobiana, citotoxicidade e os efeitos genotóxicos da prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* UFPEDA 398, em células normais e tumorais, visando contribuir para a ratificação da prodigiosina como um potencial agente anti-tumoral e atividade antibiótica.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana, citotóxica e os efeitos genotóxicos da prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* UFPEDA 398.

2.2 Específicos

- Produzir a prodigiosina a partir de *Serratia marcescens* UFPEDA 398.
- Identificar, purificar e caracterizar a prodigiosina.
- Investigar a atividade antimicrobiana da prodigiosina.
- Mensurar os efeitos citotóxicos e indução de apoptose da prodigiosina em linhagens de células tumorais e normais.
- Avaliar os efeitos genotóxicos da prodigiosina em linhagens de células tumorais e normais.
- Evidenciar os efeitos genotóxicos da prodigiosina em células mononucleadas normais de sangue periférico humano.

Revisão de literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Serratia marcescens* e a prodigiosina

Inicialmente, o micro-organismo ficou conhecido por uma variedade de nomes, inclusive como *Chromobacterium prodigiosum* (HEJAZI e FALKINER, 1997). Mais tarde passou a ser denominado por Grimont e colaboradores., (2006) de *Serratia marcescens* sendo conhecida, assim, até o presente momento.

S. marcescens foi considerado, inicialmente, um micro-organismo não patogênico isolado em água e empregado como marcador biológico, por produzir um pigmento de coloração vermelha, denominado prodigiosina. Em 1896, após uma pequena revisão e observação de um pequeno número de incidentes descritos para a mesma bactéria, esta foi descrita como um micro-organismo patogênico (RIEBER et al., 2012; TOH et al., 2012). A primeira descrição de infecção hospitalar por *S. marcescens* foi em 1951 por contaminação do trigo, matéria-prima utilizada nas preparações em cozinha hospitalar (TAYLOR e KIANE, 1962).

O micro-organismos, *S. marcescens*, é um bacilo Gram-negativo pertencente a família *Enterobacteriaceae*. Trata-se de um patógeno oportunista de humanos que apresenta ampla distribuição podendo ser encontrado no ambiente, tendo sido isolado inicialmente em alimentos, em especial, naqueles ricos em fonte de carbono simples como a glicose ou complexas como o amido que proporcionam excelentes efeitos em sua multiplicação e produção da prodigiosina (TANG et al., 2012). Pode ser observado também em área hospitalar, onde tem sido descrito como um importante patógeno, destacando-se pelo potencial de disseminação e elevada resistência as drogas antimicrobianas de contenção e antissépticos convencionais (TARIQ e PRABAKARAN, 2010). *S. marcescens* é capaz de colonizar a pele e o trato gastrointestinal de indivíduos adultos e neonatos, persistindo por longos períodos no ambiente, principalmente hospitalar (VILLARI et al., 2001; VRIES et al., 2006 e MARAGAKIS et al., 2008).

As infecções por *S. marcescens* tem sido corriqueiras. Frequentemente são observados casos de infecções por *S. marcescens* em pacientes com câncer, como também colonizando feridas pós-operatórias e o trato geniturinário. Uma das maiores preocupações com o micro-organismo encontra-se associada ao seu potencial de resistência aos antimicrobianos convencionais. Durante os últimos 15 anos este micro-organismo tem apresentado resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos (HEJAZI et al., 1997; JONES et al., 2000; RAIMOND et al., 2001). Esta multirresistência é decorrente da codificação de plasmídeos de

resistências cuja ação específica faz de *S. marcescens* um micro-organismo de difícil controle (RUIZ et al., 2003).

S. marcescens é produtora de metabólitos secundários e enzimas de importância industrial como quitinases, proteases, lipases, nucleases, bacteriocinas e surfactantes e pigmentos naturais como a prodigiosina (HARRIS et al., 2004). A prodigiosina (Figura 4) é um pigmento vermelho natural pertencente à família das prodigininas. Este pigmento é um alcalóide que apresenta uma estrutura química formada por um tripirrol de cadeia linear, peso molecular de 323, 4 m/z e fórmula estrutural representada por $C_{20}H_{25}N_3O$. Todos os pigmentos representantes desta família apresentam comumente em sua estrutura química três pirróis (Figura 1) denominado de prodigiosenoque é um esqueleto comum (VAN HOUDT et al., 2007). A estrutura química da prodigiosina corresponde ao 2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno (KIM et al., 2008). Este pigmento caracteriza-se por ser bastante sensível a luz, insolúvel em água, moderadamente em álcool e solúvel em clorofórmio, benzeno, acetona, éter e éter de etila, sofrendo variação de coloração dependendo do pH do meio em que é produzido. Segundo Bennetti e Bentley et al., (2000) e Nakashima et al., (2005), quando o pigmento é produzido em pH ácido, este se apresenta com uma pigmentação vermelho intenso com absorbância máxima em 537 nm. Em meios alcalinos pode variar de laranja a amarelo, com absorbância máxima em 470 nm. A prodigiosina desperta grande interesse pela notada ação imunossupressora, bem como mediadora do efeito apoptótico em células cancerígenas humanas e atóxicas às células sadias (KIM et al., 2007).

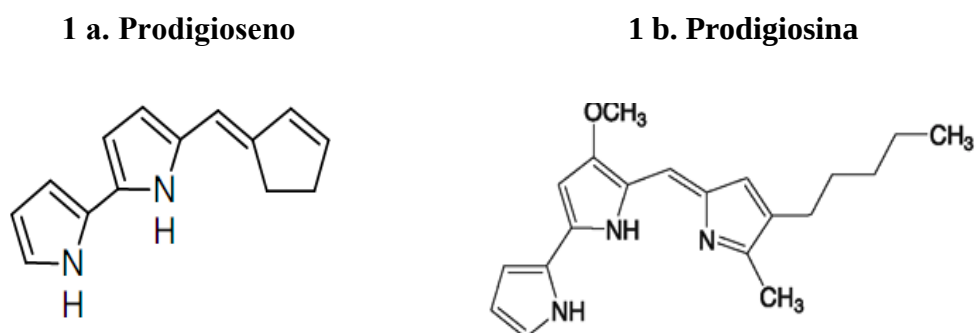


Figura 1. Estrutura química do prodigioseno (1 a) e da prodigiosina (1 b) (ELAHIAN et al., 2013).

3.2 Biossíntese da Prodigiosina

A biossíntese da prodigiosina envolve um conjunto de 20.960 pares de bases (pb) com 10 genes pró-prodigiosina ativos tais como *PigG*, *PigA*, *PigI*, *PigE*, *PigF*, *PigJ*, *PiH*, *PiC*, *PigN*. Estes genes reúnem o grupo dos genes denominados de *Pig*, que variam de A a N, conforme observado na figura 2.

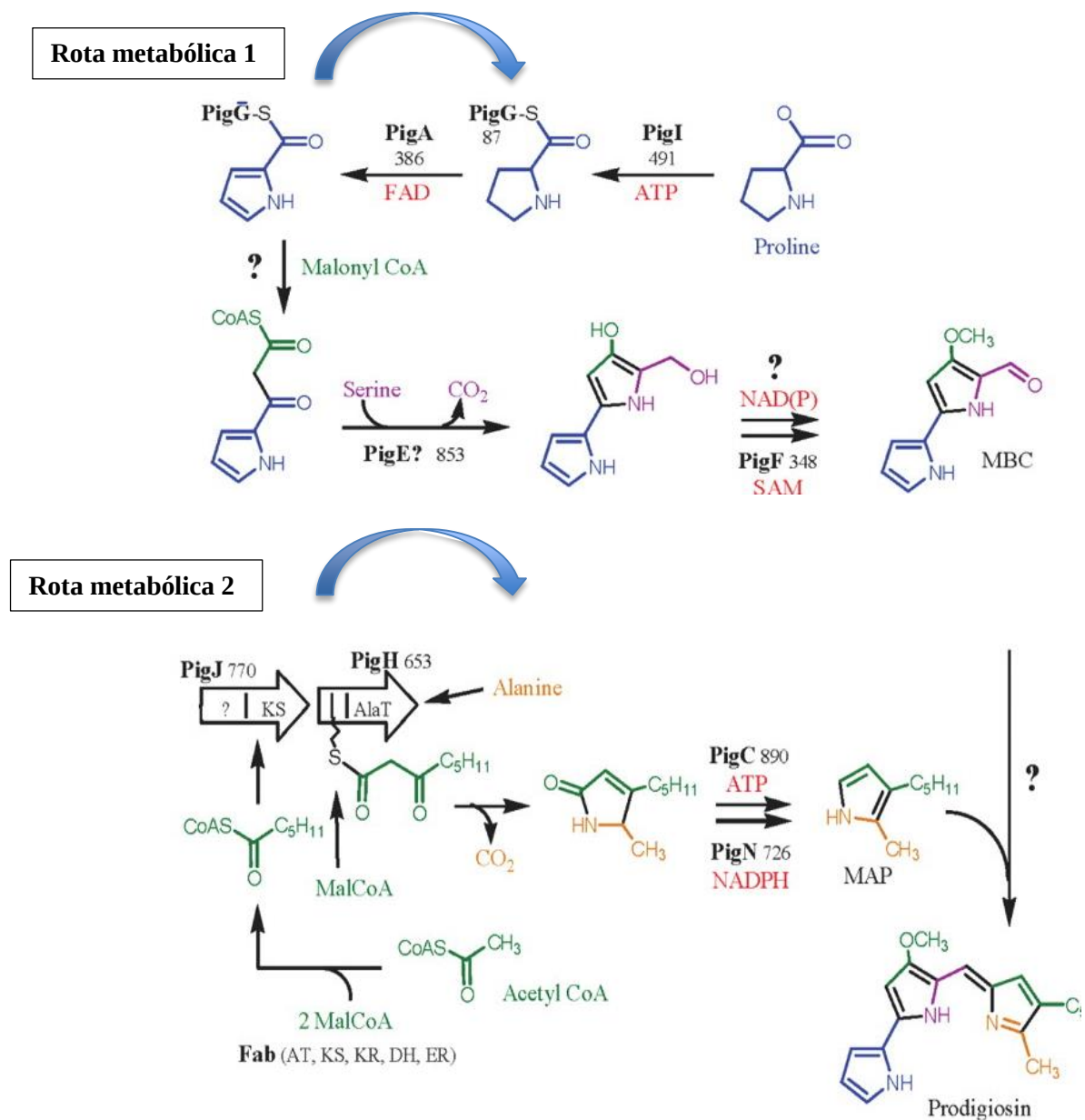


Figura 2. Biossíntese e regulação gênica da prodigiosina (HARRIS et al., 2004).

Esta biossíntese ocorre por duas rotas paralelas formadoras de seus precursores, o monopirrol (2-metil-3-n-amil-pirrol-MAP) que reúne cinco destes genes, e o bipirrol (4-metoxi-2,2-bipirrol-5-carboxaldeído-MBC) reunindo quatro destes genes. Em adicional, observa-se que quatro destes genes não estão diretamente envolvidos com as proteínas formadoras da prodigiosina, como o gene *PigL* (HARRIS et al., 2004). As rotas paralelas que formam o MAP e MBC sofrem um processo de bifurcação a partir da condensação enzimática de seus precursores, convergindo-se e, conseqüentemente, resultando na formação da prodigiosina (Figura 2). A biossíntese da prodigiosina é regulada por múltiplos fatores, incluindo um sistema de regulação da expressão gênica, via *LuxIR* homólogos, *SmaI* e *SmaR* (*Quorum-sensing system*) em resposta a flutuações na densidade populacionais celulares (SLATER et al., 2007).

Inicialmente a biossíntese do pigmento ocorre com a formação dos precursores MBC, onde observa-se a expressão dos genes *PigG*, *PigA*, *PigI*, *PigE* e *PigF* e a formação do MAP cuja síntese envolve a expressão dos genes *PigJ*, *PigH*, *PigC* e *PigN*. Por fim, sugere-se uma condensação enzimática dos precursores associados à expressão específica dos genes *PigC*, *PigN* e o *PigF*, que apresentam receptores N-terminal e C-terminal para este processo a partir de reações de oxirredução formando a prodigiosina (SYDOR et al., 2001).

Cerdeño, et al., (2001) descrevem que os substratos precursores da formação do MAP são malonil, alanina e prolina e do MBC é a serina onde ocorre a incorporação da prolina em uma das rotas de formação do MAP. O autor tem sugerido que este seja um caminho para a formação do undercilprodigiosina, um outro pigmento pertencente a mesma família da prodigiosina (CERDEÑO et al., 2001; BURKE et al., 2007).

Fineran et al., (2005), descrevem que o uso de elementos de transposição (*transposons*), que são sequências de ácido desoxirribonucleico capazes de se movimentarem de uma região para a outra em um genoma de uma célula associados a *Lac Z* grupo específico de genes observados em micro-organismos mutantes demonstraram efeito redutor da expressão do gene *PigP* e de outros grupos de genes associados à regulação da síntese da prodigiosina, bem como de seus precursores, não sendo observado produção de prodigiosina nesses mutantes.

3.3 Atividade biológica da Prodigiosina

O pigmento prodigiosina é produzido por determinadas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A prodigiosina produzida por *S. marcescens* gram-negativa

apresenta um grupo alquila de cadeia linear. Como a prodigiosina, existem outros três grupos de pigmentos pertencentes a mesma família, prodiginina. Esses três últimos grupos diferem da prodigiosina por apresentarem derivados cíclicos em suas estruturas como o butil-meta-ciclo-heptilprodigiosina (ELAHIAN et al., 2013). A prodigiosina tem despertado grande interesse em diversas áreas devido às suas atividades biológicas, descritas como antimicrobiana, antifúngica, imunossupressora e antitumoral induzindo apoptose em linfócitos T e B (HAN et al., 2009; AHMAD et al., 2012).

Nos últimos anos, a busca pelo conhecimento sobre a atividade citotóxica da prodigiosina tem sido intensificada, sendo descritos efeitos citotóxicos em linhagens de células tumorais como pulmão, cólon, rins, mama, e baixa toxicidade observadas em células normais (LIU et al., 2005). Na tentativa de avaliar os efeitos citotóxicos da prodigiosina, o Instituto Nacional do Câncer realizou testes com 60 diferentes tipos de linhagens tumorais onde a substância apresentou uma índice de toxicidade induzindo a apoptose em 50% de uma dada população de células estudadas, na concentração de 2,1 $\mu\text{M/mL}$, sendo o pigmento prodigiosina considerado como uma droga com potencial atividade citotóxica dirigidas às células tumorais (WILLIAMNSON et al., 2006; PERÉZ-TOMÁZ e VIÑAS, 2010).

Foram observados efeitos citotóxicos da prodigiosina, *in vivo*, em camundongos xenoabióticos enxertados com linhagens Huh-7 (linhagem de células hepáticas tumorais). Observou-se que o pigmento induziu as células a entrarem em apoptose de forma independente da atuação conjunta com a proteína p53 reguladora, que sofre mutação em células tumorais (HO et al., 2009). Vale ressaltar que a prodigiosina não sofre ação das bombas de resistência às substâncias citotóxicas, como as proteínas de multirresistência a drogas (MDR), que são proteínas canais e encontram-se presentes na membrana plasmática de algumas células animais cuja função é a expulsão de compostos citotóxicos (SOTO-CERRATO et al., 2004).

Em estudos citotóxicos, Zhang et al., (2005), apontam que, após a administração de doses diárias da prodigiosina (5mg / Kg e 10 mg / Kg) no tratamento do melanoma BL16 em ratos, foi observada redução de nódulos metastáticos em 50% dos animais e consequentemente, aumento da sobrevivência dos mesmos.

Regourd et al., (2007), corroboram com Zhang et al., (2005), afirmando que tais efeitos são consequência da inibição do mecanismo de migração celular e ligação à matriz extracelular, resultantes da redução da expressão das proteínas RhoA e RhoGTPase, responsáveis pelo processo de adesão e motilidade celular. Contudo, os efeitos genotóxicos para prodigiosina ainda não foram descritos na literatura.

3.4 Atividade antimicrobiana da prodigiosina

O gênero *Serratia* spp compreende ao grupo de bactérias gram-negativas, classificadas na grande família de *Enterobacteriaceae*. *Serratia* spp pode ser distinguida de outros gêneros pelo seu potencial de produção de três enzimas especiais DNAase, lipase e gelatinase (ALIHOSSEINI et al., 2008). No entanto, outras características podem ser observadas contribuindo assim para o entendimento do potencial de patogenicidade, como as atividades de adesão e motilidade, e ainda a produção de enzimas extracelulares, ou seja, nucleases, proteases e hemolisinas. *Serratia marcescens* é a única espécie patogênica embora existam raros relatos de infecções *S. plymthica*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea*, *S. odifera* (KHANAFARI et al., 2006). *S. marcescens* é produtora do pigmento vermelho denominado prodigiosina. A prodigiosina tem sido bastante estudada, nos últimos tempos, devido as suas atividades biológicas observadas. Dentre as distintas atividades biológicas foi descrita a atividade antimicrobiana, sendo encontradas concentrações mínimas inibitórias (IMC's) quando comparados com os antibióticos convencionais tetraciclina, clorafenicol e gentamicina frente a diversas espécies bacterianas como *Staphylococcus aureus* FDA 209P (IMC 3.1 µg/mL), *Streptococcus pyogenes* (IMC 1.56 µg/mL), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (IMC 3.1 µg/mL), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (IMC 12.5 µg/mL), *Escherichia coli* K12 (IMC > 100 µg/mL), *Klebsiella pneumoniae* PCI 602 (IMC > 100 µg/mL), *Salmonella typhimurium* IID 971 (IMC 25 µg/mL), *Serratia marcescens* IAM 1184 (IMC > 100 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (IMC > 100 µg/mL), *Proteus vulgaris* HX 19 (IMC 50 µg/mL) (NAKASHIMA et al., 2005). Foram descritas também sensibilidades a prodigiosina observadas pelo teste de difusão de disco em ágar segundo Cang et al., (2000); Someya et al., (2001); Khanafari et al., (2006) e Alihosseini et al., (2008), onde foram observaram-se significativos halos de inibição do crescimento bacteriano para as espécies *Escherichia coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Estes dados observados demostram os feitos antimicrobianos da prodigiosina frente a diversas espécies bacteriana patogênica sugerindo o seu uso como um potente antibiótico natural.

3.5 Câncer: Definições e generalidades.

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento desgovernado de células modificadas (ALMEIDA et al., 2005). O termo câncer faz referência a neoplasias,

especificamente tumores malignos. O termo advém do grego *Karkinos*, e no latim significa caranguejo. A analogia ocorre pela semelhança entre as veias intumescidas do tumor e as patas do animal que buscam a fixação local, como também pela agressividade e imprevisibilidade de ambos (JOHANNES et al., 1986).

Os estudos voltados para o entendimento desta patologia, encontram-se diretamente relacionados à genética. Logo o câncer é resultante de alterações que se acumulam progressivamente no material genético (DNA) de uma célula normal. Desta forma, o mesmo é considerado uma doença genética e a identificação e caracterização dos genes alterados tornam-se fundamentais para compreensão das bases moleculares desta doença (HOLLEY et al., 2007). Existem alguns termos sinônimos de câncer como tumor, neoplasma ou blastomas, contudo todos eles referem-se ao crescimento celular descontrolado no nível tecidual (SIMPLICIO et al., 2002).

O câncer é caracterizado por dois aspectos importantes, como o crescimento incontrolado de células cuja origem advém de tecidos normais e pela rápida difusão tecidual, caracterizando a sua agressividade, resultante de morte das células vizinhas induzindo a formação de estágios avançados da doença, como a metástase. (COOKSON et al., 2007). Os tipos mais comuns de câncer são os de pele, mama, próstata, pulmão e estômago sendo os quatro últimos os que apresentam maiores preocupações de ordem de saúde pública, oferecendo maior risco de morte atualmente no Brasil (BULEJE et al., 2002; POLAN et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013; ZAMBONI et al., 2012 e DEMIDIUK et al., 2013).

Há algumas características genéticas e bioquímicas diferenciais entre as células normais e neoplásicas. Inicialmente, as alterações que induzem as neoplasias estão diretamente relacionadas a um grupo especializado de genes como os protooncogenes (BAKER et al., 2005). Estes genes (Figura 3), que em células normais são inativados, estão envolvidos nos mecanismos de regulação da proliferação celular e apoptose (ALMEIDA et al., 2005).

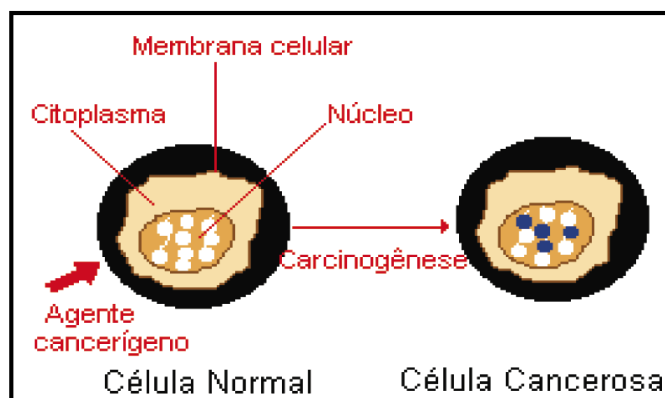


Figura 3. Transformação da célula normal em neoplásica (ALMEIDA et al., 2005).

Nas células neoplásicas os protooncogenes são encontrados em sua forma ativada, mais conhecido como oncogenes. A proteína codificada por estes genes difere dos seus parentes homólogos tanto em tamanho quanto em função. Esta proteína foi identificada pela primeira vez em vírus com potencial atividade na indução de formações tumorais observáveis *in vivo*, em animais e *in vitro* em culturas de células neoplásicas (LAND, PARADA e WEINBERG, 1983; JOHANNES 1989; TRAVALI et al., 1991). Sendo assim, a formação de tumores encontra-se diretamente relacionada a presença dos oncogenes nas células alteradas. Desta forma, estas células diferentes são denominadas cancerosas ou neoplásicas cuja principal característica observada é a proliferação descontrolada (DELL'AVERSANA, LEPORE e ALTUCCI, 2012; ZAMKOVA et al., 2013). Esta intensa multiplicação celular, além de interferir nas características morfológicas teciduais locais, interfere também na funcionalidade dos vasos sanguíneos presentes, sendo necessário a formação de novos vasos sanguíneos que transportem nutrientes e oxigenação para as células neoplásicas. Logo, a massa celular, formada a partir deste processo de manutenção da origem aos tumores. Estes, inicialmente, são locais ou podem atingir estágios mais avançados com capacidade de se desprenderem da região local, migrando para o tecido sanguíneo ou o sistema linfático, atingindo outros órgãos e tecidos vizinhos, como nos casos de metástases (PIACENTINI et al., 2012).

Em adicional, as células neoplásicas perdem algumas características específicas quanto às funções observadas em células normais. Estas células cancerígenas perdem a capacidade de reconhecimento celular, secreção e síntese de moléculas, e tem o seu ciclo celular totalmente alterado, sendo observadas interfases, fases de duplicação do material genético (DNA),

seguidas de sucessivas e descontroladas divisões celulares. Consequentemente, como um processo progressivo, muitas vezes, a curto prazo, os tecidos invadidos vão também perdendo suas funções e comprometendo os órgãos (MARTINEZ et al., 2012).

Atualmente, o tratamento desta doença é realizado a partir das terapias antineoplásicas que utilizam diversos agentes radioterápicos ou quimioterápicos e processos mais invasivos como as cirurgias. Novas pesquisas tem sido desenvolvidas neste sentido, em busca da promoção da cura desta patologia em menor tempo, diminuindo o sofrimento do paciente resultante dos efeitos colaterais observados durante o tratamento e promovendo o alívio e bem-estar do mesmo.

3.6 Epidemiologia do câncer

O Câncer é um problema mundial de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer apresenta-se como a terceira maior causa do número de mortes no mundo, com 12% de mortalidade, matando cerca de 6 milhões de pessoas por ano (INCA, 2012). Em países de primeiro mundo, em média, uma em cinco pessoas morrem de câncer. Nos Estados Unidos, em 2012, foram estimados casos de morte por câncer em ambos os gêneros masculino e feminino, sendo o maior número de casos observados para o câncer do sistema geniturinário, seguido de câncer do sistema digestivo, sistema respiratório e em menores números de casos, para o sistema sanguíneo e linfático como os linfomas com números de casos menores que 80.000 e leucemias linfocíticas agudas e crônicas um pouco menos que 50.000 (SIEGEL et al., 2012).

Nos países da América Latina, observa-se um aumento gradativo das doenças crônico-degenerativas como as doenças cardiovasculares que ocupam o primeiro lugar nos índices de mortalidades. Contudo, em alguns países subdesenvolvidos podem ser observadas uma inversão nesta ordem com o câncer ocupando o primeiro lugar em números de novos casos de óbitos. No Brasil, o câncer é considerado a segunda maior causa de mortes por doenças (Figura 4), estimando-se, em 2012, números de novos casos bem maiores do que os encontrados em 2005 (337 mil novos casos e 122.600 mortes), demonstrando estatisticamente que a cada ano há um aumento de novos casos de câncer e mortes consecutivamente (INCA, 2012).

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%		Homens	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Figura 4 . Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2012, na população brasileira (INCA, 2012).

3.7 Processos de carcinogênese

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação do câncer, ocorre lentamente podendo levar a célula cancerosa a se proliferar originando novas células tumorais e resultando em um tumor visível. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar a instalação do tumor e é decorrente de mutação que interfere nos mecanismos de regulação, diferenciação e proliferação celular (CALY et al., 2013).

Os diferentes tipos de câncer estão diretamente relacionados aos diversos tipos celulares que constituem o nosso corpo. Logo, se as células cancerígenas encontram-se no tecido epitelial, como pele e mucosas, este é denominado de carcinoma e se tiverem início em tecidos de sustentação como conjuntivos (cartilágino, ósseo, muscular, adiposo) este é conhecido como sarcoma (FACINA et al., 2012).

Dentre os agentes carcinogênicos são observados três classes distintas cujos alvos de ação são específicos tais como: 1) os agentes oncoiniciadores, capazes de provocarem o dano genético direto nas células e iniciando o processo de carcinogênese (o benzopireno, um dos componentes da fumaça do cigarro e alguns vírus oncogênicos), 2) agentes oncopromotores, atuando especificamente sobre as células iniciadas e transformando-as em malignas (os agentes presentes na alimentação e exposição prolongada e excessiva a hormônios), e 3) os agentes oncoaceleradores, que provocam multiplicação descontrolada e irreversível das células

alteradas, atuando geralmente no estágio final do processo (MAZZAFERRI et al., 2012; INCA, 2003).

Os estágios que compreendem a carcinogênese são iniciação, promoção e progressão (Figura 5). O estágio de iniciação é caracterizado por apresentar células que sofreram ação dos agentes carcinógenos cujos efeitos são cumulativos, provocando modificações em alguns de seus genes. Nesta etapa as células se encontram, geneticamente alteradas, contudo ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente (INCA, 2003).

O segundo estágio é o de promoção, caracterizado por apresentar células iniciadas, ou seja, que sofreram alterações do seu material genético, na etapa inicial da exposição aos agentes oncoiniciadores. Nesta etapa as células iniciadas sofrem alterações por exposição aos agentes oncopromotores, onde a célula é transformada em maligna de forma lenta e gradual. Entretanto, para que ocorra essa transformação é necessário que a célula permaneça por um longo tempo de exposição ao agente carcinógeno promotor. Logo, a suspensão da exposição a esses agentes interrompe o processo de evolução da doença (NICHELE et al., 2012). O terceiro estágio é a progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesta etapa o câncer já se encontra instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Os agentes que promovem tal evolução são denominados oncoaceleradores ou carcinógenos como o fumo, considerado um agente carcinógeno completo, pois apresenta constituintes que atuam nos três estágios da carcinogênese (ZANDONAI et al., 2012).



Figura 5. Estágios de formação do câncer (INCA, 2012).

3.8 Terapias antitumorais

Mundialmente os tratamentos contra o câncer reúnem um conjunto de técnicas e procedimentos classificados como cirurgias, quimioterapia e radioterapias (FOYE et al., 1996; MURAD et al., 2003). Também têm sido aplicadas técnicas de foto-radiação com derivados hematoporfirínicos e a imunoterapia (SALMONM et al., 2003; MACHADO et al., 2000).

A técnica de cirurgias pode resultar na remoção total ou parcial dos tumores, este último procedimento sendo recomendado em casos de metástase. No caso das leucemias, esta técnica é inapropriada sendo necessária a utilização de um outro procedimento de tratamento do câncer, como por exemplo o transplante de medula. Já a radioterapia utiliza os raios gama, radioisótopos como o cobalto 60, raios-X, prótons e mésons π negativos. Estes são usados, geralmente, em comum com a cirurgia como um incremento na eficiência do tratamento. Isoladamente, a radioterapia tem sido bastante efetiva no isolamento e redução de tumores (TONETO et al., 2012).

A técnica de foto-radiação representa um importante avanço no que se refere às terapias convencionais contra o câncer. Esta permite a localização e destruição com maior seletividade, pelo uso de radiação específica com fluorescência (λ de 620-640 nm), para a detecção e destruição de tumores com uso de fibras óticas. Contudo, devido ao intenso acúmulo de porfirina essa técnica não é recomendada para o uso interno e, sim, apenas para tumores superficiais (VOLPATO et al., 2005). Em adicional, as imunoterapias fazem uso de estímulos das defesas do próprio corpo para combater as células tumorais. Esta técnica, apesar de ser promissora, é ainda bastante adjuvante, usadas apenas para destruição de células tumorais após intervenções cirúrgicas (DERCHAIN et al., 2007).

A quimioterapia é um outro procedimento utilizado para destruir as células tumorais preservando as células normais. Entretanto, a ação da maioria destes agentes é inespecífica. Como exemplo de quimioterápicos tem-se as drogas antineoplásicas, onde sua aplicação está associada aos diferentes mecanismos de ação, observados decorrentes da presença dos diferentes grupos funcionais presentes na estrutura molecular destas substâncias (COSTA e CHAVES, 2013). Após o tratamento com esses agentes é notado que o corpo tende a se recuperar dos possíveis efeitos colaterais observados e ainda, a aplicação destas drogas requer a observação dos benefícios confrontando diretamente a sua efetividade e citotoxicidade em busca de um índice terapêutico favorável (FOYE et al., 1996; MURAD, 2003; SALMONM et al., 1998).

Apesar dos avanços obtidos pela medicina convencional, tem sido observado um crescente interesse na Medicina Alternativa e Complementar (MAC), principalmente em países ocidentais desenvolvidos, em desenvolvimento e pobres (SPADACIO et al., 2010). As MAC's configuram, atualmente, opções alternativas em potencial para o cuidado com a saúde, com relação a prática terapêutica convencional. O crescimento do uso dessa medicina torna-se evidente nos casos de pacientes com câncer. Há uma busca científica muito grande a fim de tentar esclarecer os procedimentos desta medicina alternativa, seus riscos e benefícios, mecanismos toxicológicos das MAC's utilizadas isoladamente ou em associações com as drogas convencionais, a necessidade de avaliar algumas intervenções e a possibilidade de incorporá-las à prática medicinal convencional (TOVEY et al., 2006). Neste sentido, algumas substâncias naturais como extratos de plantas, metabólitos secundários produzidos por animais, fungos e bactérias tem sido descritos como promissores antineoplásicos empregados alternativamente nas terapias MAC's visando o sucesso no tratamento contra o câncer (SPADACIO e BARROS, 2008).

3.9 Avaliação de mutagenicidade e danos genômicos (Ensaio de genotoxicidade)

Os organismos vivos estão frequentemente expostos a agentes ambientais que podem induzir modificações químicas tanto em nível celular quanto molecular. Essas alterações podem ser causadas por agentes químicos, físicos ou biológicos que são tóxicos e, portanto, prejudiciais à célula (HEDDLE et al, 1983). Essas substâncias tóxicas são classificadas, em geral, como agentes genotóxicos cujo principal alvo é o DNA (Figura 6).

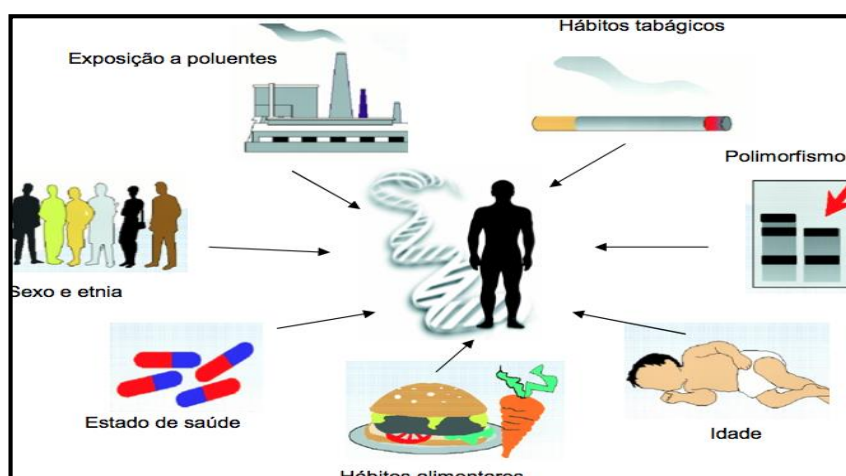


Figura 6. Influências para respostas indutoras da formação de micronúcleos (Ksaprzak et al., 1991).

Portanto, os agentes genotóxicos são aqueles que interagem diretamente com o DNA produzindo significativas alterações em sua estrutura ou função, que podem ser fixadas e transmitidas, resultando nas mutações (ESTERBAUER, 1993). As mutações representam a fonte de variabilidade genética entre as populações. Contudo, são resultantes das heranças genéticas de diversas patologias. Nas populações podem induzir o aumento da frequência de câncer, doenças hereditárias e cardiopatias, bem como aumentar a virulência de patógenos (GONZALES et al., 2011).

Os agentes genotóxicos são administrados diretamente, como no caso da fumaça do cigarro, que é rica em peróxidos, superóxidos e produtos nitrogenados. Podem também resultar da metabolização de alimentos e bebidas alcoólicas cujos metabólitos são nitrosaminas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e acetaldeído (ZIEGLER et al., 1986; HADNAGY et al., 1988; PIYATHILAKE et al., 1995; CARLETTI et al., 2002). Entretanto, a evolução de uma célula normal para uma célula com alto poder mitótico é um processo longo e, conseqüentemente, é decorrente do acúmulo a exposições sucessivas aos agentes indutores. Assim, o defeito genético acumula-se entre as fases de pré-malignidade e malignidade e expressa-se, entre outras formas, pelo aumento do conteúdo nuclear, pela formação de fragmentos de DNA nas células expostas ou pela expressão de proteínas oxidativas. Tais alterações observáveis indicam que essas células estão em processo de transformação maligna e podem, portanto, funcionar como marcadores indicativos do grau de exposição do tecido aos carcinógenos (HANS et al., 1986; DUTHIER et al. 1996).

Os ensaios de genotoxicidade reúnem um grupo variado de métodos, como o Teste de Ames (*Salmonella* /microsoma) descoberto pelo pesquisador da Universidade de Berkeley, Califórnia, Dr. Bruce Ames e colaboradores (1975), ao desenvolver um método de curta duração que combinava um sistema de metabolização *in vitro* (fração S9), demonstrando uma alta correlação entre mutagênicos e carcinógenos conhecidos (AMES et al., 1975). Atualmente, para melhor compreensão dos processos de alterações cromossômicas, induzidos por substâncias químicas, resultantes de microformações nucleares, tem sido empregado os testes de micronúcleo e o ensaio cometa, específicos para avaliação de mutagenicidade e de intensidade de danificação genômica após exposição a determinado agente genotóxico (SUDHEER et al., 2008). Esses testes, micronúcleo (*Micronuclei assay*) e o ensaio cometa (*Cometa assay*) apresentam, ambos, vantagens adicionais por se tratarem de métodos de curta duração, alta precisão e rápida obtenção dos resultados (GONZALES et al., 2011).

3.9.1 Teste de micronúcleo em linfócitos de sangue periférico humano

O teste de micronúcleo (MN) é bastante utilizado para analisar a genotoxicidade *in vitro* e biomonitorização de exposição de efeito (NORPPA e FALCK et al., 2003). Este teste se constitui em um dos métodos para medidas de danos cromossômicos espontâneos ou induzidos, ou ainda de erros de segregação cromossômica, uma vez que os micronúcleos resultam da produção de fragmentos acêntricos (Figura 7) ou de cromossomos que são mais lentos no processo de migração para os polos opostos das células, observados durante a divisão celular na fase da anáfase (D'AGOSTINI, 1993).

Os danos no DNA induzido por substâncias de origem natural ou sintética, ou ainda pela atividade física, é uma área de estudo de grande interesse da toxicologia genética, uma vez que as mutações em cromossomos é um evento de significativa relevância na carcinogênese (FENECH, et al., 2006). A primeira utilização do método “*Teste de micronúcleo*” foi em 1959 na tentativa de analisar as alterações cromossômicas (EVANS et al., 1959). Mais tarde, o teste foi aplicado para análise da detecção de micronúcleo em culturas de linfócitos de sangue periférico humano (HUBER et al., 1990). Na atualidade, são utilizados diferentes tipos celulares para avaliação do dano genético, como células epiteliais, eritrócitos e fibroblastos (PINTO, 2008). A escolha dos linfócitos para realização dos testes é bastante vantajosa pois, este tipo de célula despende pouco tempo de cultura e maior tempo de vida útil, com cerca de 1095 dias, o equivalente a três anos, quando comparados com as células do epitélio bucal com 21 dias e eritrócitos com 120 dias apenas (RAMALHO et al., 1995).

Os micronúcleos quando observados ao microscópio, são estruturas semelhantes ao núcleo principal da célula, de pequenas dimensões e extra nucleares, que podem derivar de duas origens distintas: a quebra de cromossomos ou a perda de material genético no cromossomo (Figura 8). Assim, a sua formação representa dano genético provocado por agentes genotóxicos com dois modos de ação distintos: clastogênicos ou aneugênicos. Os agentes clastogênicos (causadores de rupturas cromossômicas), agem induzindo a formação de MN que contêm no seu interior fragmentos de cromossomos resultantes da quebra de uma ou duas cadeias de DNA. Nos casos em que a reparação do erro não ocorre, esta quebra de cromossomos poderá dar origem a um rearranjo assimétrico com a formação de um cromossomo dicêntrico, ou seja, com dois centrômeros e um fragmento acêntrico (FENECH e MORLEY, 1985).

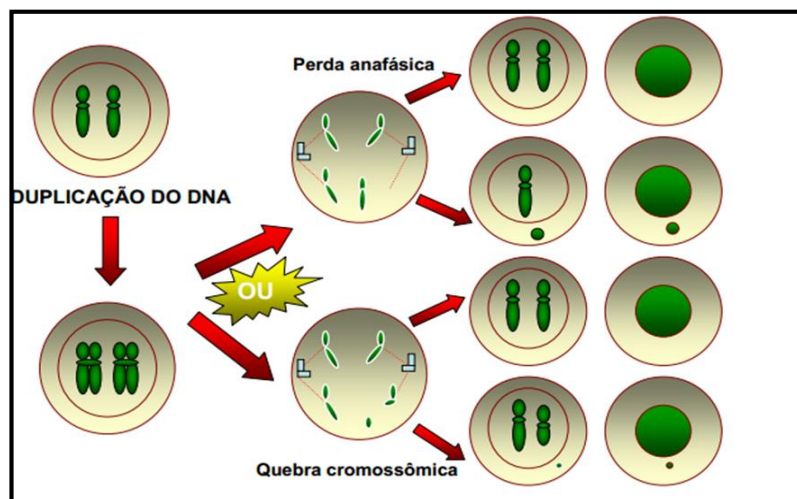


Figura 7. Mecanismo de formação dos micronúcleos MN (FENECH et al, 2003).

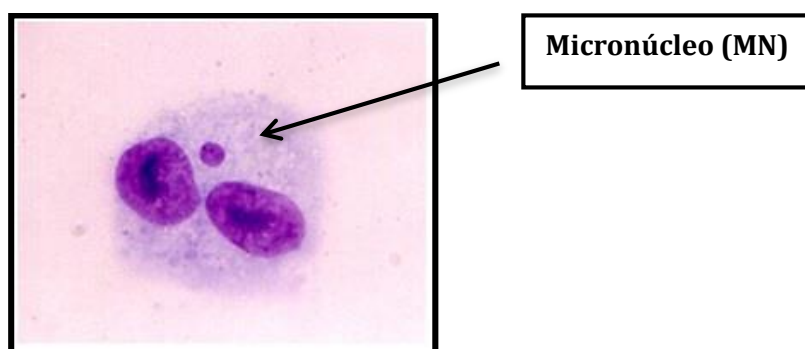


Figura 8. Célula binucleada com evidente micronúcleo (PACHECO e HACKEL, 2002).

O primeiro fragmento é arrastado para os polos opostos da célula durante a anáfase e forma uma ponte núcleo plasmática entre os núcleos da célula filha. O segundo fragmento sofre um atraso dando origem a um micronúcleo individualizado que não é incluído no núcleo da célula filha na fase da telófase ou separação citoplasmática das duas células diploides (HAGMAR et al., 2000; BONASSI e AU., 2002; THOMAS et al., 2003). No caso dos agentes com modo de ação aneugênica (que induzem aneuploidias ou segregação cromossômica anormal), o MN é formado com um cromossomo inteiro que sofreu um atraso quando da ascensão aos polos. Este atraso na ascensão dar-se-á por falhas no fuso mitótico ou por danos estruturais no cromossomo (VOLDERS et al., 2000).

3.9.2 Ensaio cometa alcalino (Alkaline comet assay)

Um outro teste bastante empregado para mensurar os efeitos genotóxicos de um composto é o Ensaio Cometa alcalino (*Single Cell Gel Electrophoresis*). O método permite a obtenção de uma grande quantidade de dados em células individuais, e requer um número extremamente pequeno de células, (< 10.000), sendo bastante sensível e podendo ser realizado com qualquer tipo de célula eucariótica. Trata-se de uma técnica rápida e eficiente quando usada para detectar eventos de danificação genômica das células de mamíferos, quando expostas a agentes genotóxicos (SINGH et al., 1988; FAIRBAN et al., 1995). Neste tipo de ensaio, as células são aplicadas em um gel de agarose de baixo ponto de fusão (Agarose LM) sobre lâminas de microscópios, previamente preparadas, e, a seguir, estas células são lisadas e submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino.

De acordo com Sigh et al., (1988) o método alcalino permite a detecção de quebras duplas e simples na estrutura helicoidal do DNA. A presença de quebras simples, sítios lábeis alcalinos (locais em que a cadeia polinucleotídica sofre quebra quando há incubação do DNA em pH elevado) e ligações cruzadas em posições diferentes no DNA (*crosslinks*), resultantes da ação de compostos genotóxicos, alteram a estrutura do DNA das células, que normalmente encontra-se altamente compactado, resultando em relaxamento em partes da molécula que migram em direção ao cátion. Desta forma, após a aplicação de corantes específicos, pode-se visualizar, em microscópio de fluorescência, a migração do DNA, que se assemelha a um cometa (TICE et al., 2000). A capacidade de migração do DNA é diretamente proporcional ao dano ocorrido na molécula, como também da quantidade de extremidades livres que, mesmo ligados a segmentos maiores, migram numa distância pequena do corpo do cometa (Figura 9).

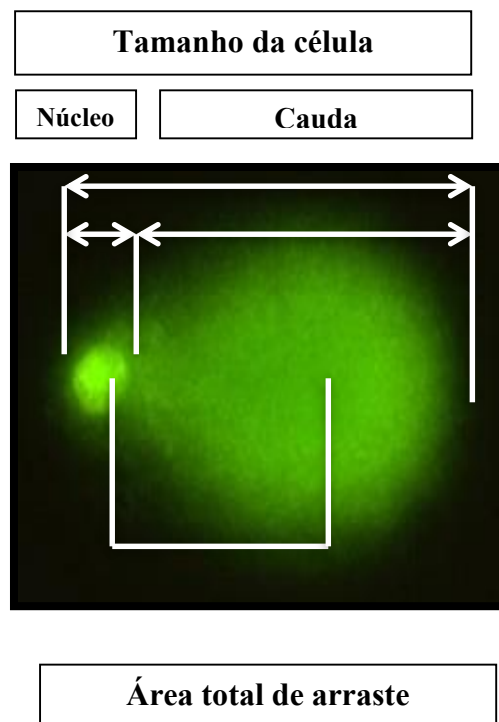


Figura 9. Ensaio cometa alcalino (Modificado de AUCICEK et al., 2008).

O ensaio cometa segundo Sight et al., (1988) baseia-se na observação por epifluorescência de 4 níveis de danificação genômica (Figura 10): dano 0 (nenhuma lesão ou dano visível no DNA e ausência de fragmentação nuclear); dano 1 (detecção de leve danificação no DNA e leve fragmentação nuclear com discreta formação de halo); dano 2 (danificação moderada no DNA e fragmentação nuclear visível com formação de um halo extenso) e o dano 3 (danificação intensa no DNA e observação de um halo bastante extenso, ao redor, do pouco material nuclear e a formação de uma cauda semelhante a de um cometa, sendo este ultimo, a forma mais grave de danificação).

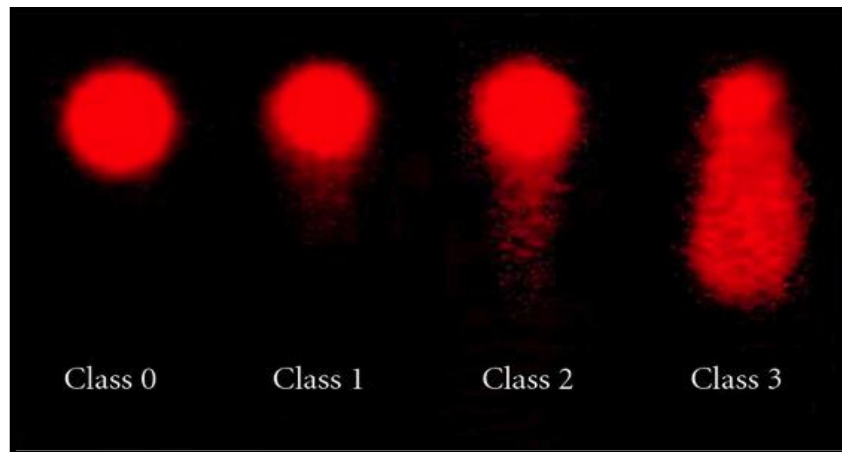


Figura 10. Ensaio cometa: classificação de dano genômico (SINGH et al., 1988).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, W.; AHMAD, W.Y.W.; ZAKARIA, Z.A.; YUSOF, N.Z. Isolation of Pigment-Producing Bacteria and Characterization of the Extracted Pigments. Springer Briefs in Molecular Science, 25-44, 2012.
- ALIHOSSEINI, Farzaneh et al. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. **Biotechnology progress**, v. 24, n. 3, p. 742-747, 2008.
- AYCICEK, A.; KOCYIGIT, A.; ERNEL, O.; SENTURK, HAKAN. Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. J. Pediatr, 84, 2008.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. Quim. Nova, 28(1): 118-129, 2005.
- BAKER, A.F.; DRAGOVICH, T.; IHLE, N.T.; WILLIAMS, R.; FENOGLIO-PREISER, C.; POWIS, G. Stability of Phosphoprotein as a Biological Marker of Tumor Signaling. Clinical cancer reseach, 2005.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; JUNIOR, F.A DO NASCIMENTO.; TOMAZ, A.C.A.; ATHAYDE-FILHO, P.T.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA L.M.; DINIZ, M.F.F.M. Rev. Bras. Farmacogn, 17, 2007.
- BEATRIZ, M.; CASTILHO-ÁVILA, W.; MARTINELL, M.; OLLINGER, R.; AYMAMI, J.; GIRALT, E.; PÉREZ-TOMÁZ, R. DNA Interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. Toxicological Sciences, 85: 870-879, 1998.
- BENNETT, J.W.; BENTLEY, R. Seeing red: The story of prodigiosin. Advances in Applied Microbiology, 47: 1-32, 2000.
- BONASSI, S.; AU, W.W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 511(1): 73–86, 2002.
- BULEJE, J.S.; YÁBAR, A.B.; GUEVARA-FUJITA, M. Características Genético-Moleculares de los Tumores Estromales Gastrointestinales (GIST). Rev. Gastroenterol. Perú, 32-4: 394-399, 2012.
- BURKE, C.; THOMAS, T.; EGAN, S.; KJELLEBERG, S. The use of functional genomics for the identification of a gene cluster encoding for the biosynthesis of an antifungal tambjamine in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Environmental Microbiology, 9 (3), 814–818, 2007.
- CALY, D.N.; VIANA, ACKLEI.; RAPOPORT, A.; ROGÉRIO, A. D.; CURIONI, O.A.; CERNEA, C.R.; BRANDÃO, L.G. Indicações e limites da imunoistoquímica no câncer de cabeça e pescoço. Braz. J. Otorhinolaryngol, 79(1), 2013.

CANG, Song et al. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. *Biotechnology letters*, v. 22, n. 22, p. 1761-1765, 2000.

CARLETTI, R AND ROMANO, D. Assessing health risk from benzene pollution in an urban area. *Environ. Monit. Assess*, 80: 135–148, 2002.

CERDENO, A.M.; BIBB, M.J.; CHALLIS, G.L. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicor* A3 (2): new mechanism for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chemistry & Biology*, 8: 817-829, 2001.

CHANG, C.C.; CHEN, W.C.; HO, T.F.; WU, H.S.; WEI, Y.H. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *J Biosci Bioeng*, 111 (5): 501- 511, 2011.

CLIF, M.D.; Thomson, R.J. Development of a Merged Conjugate Addition/Oxidative Coupling Sequence. Application to the Enantioselective Total Synthesis of Metacycloprodigiosin and Prodigiosin R1. *J. Am. Chem. Soc*, 131(40):14579–14583, 2009.

COOKSON, M.S.; AUS, G.; BURNETT, L.A.; CANBY-HAGINO, E.D.; DÁMICO, A.V.; DMOCHOWSKI, R.R.; ETON, D.T.; FORMAN, J.D.; GOLDENBERG, S.L.; HERNANDEZ, J.; HIGANO, C.S.; KRAUS, S.R.; MOUL, J.W.; TANGEN, C.J.; THRASHER, B.; THOMPSON, I. Variation in the Definition of Biochemical Recurrence in Patients Treated for Localized Prostate Cancer: The American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel Report and Recommendations for a Standard in the Reporting of Surgical Outcomes. *The Journal of Urology*, 177(2): 540–545, 2007.

COSTA, A.I.S.; CHAVES, M.D. Pain in cancer patients under chemotherapy. *Rev Dor*, 13(1): 45-9, 2013.

D'AGOSTINI, F.; IZZOTTI, A.; FLORA, S.D. Induction of micronudei in cultured human lymphocytes exposed to quartz halogen lamps and its prevention by glass covers. *Mutagenesis*, 8 (1): 87-90, 1998.

DAUENHAUER, S.A.; HULL, R.A.; WILLIAMS, R.P. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Serratia marcescens* genes encoding prodigiosin biosynthesis. *J. Bacteriol.* June, 158(3): 1128-1132, 1984.

DELLÁVERSANA, C.; LEPORE, ILARIA.; ALTUCCI, L. HDAC modulation and cell death in the clinic. *Experimental Cell Research*, 318 (11): 1229-1244, 2012.

DEMIDYUK, I.V.; SHUBIN, A.V.; GASANOV, E.V.; KURINOV, V.V. Alterations in Gene Expression of Proprotein Convertases in Human Lung Cancer Have a Limited Number of Scenarios. *PLos One*, 8(2): 55752, 2013.

DERCHAIN, S.F.M.; FILHO, A.L.; SYRJANEN, K.J. Cervical intraepithelial neoplasia: diagnosis and treatment. *Bras Ginecol Obstet*, 27(7): 425-3, 2005.

DIAZ, R.I.S.; BENNETT, S.M.; THOMPSON, A. Amido-Functionalised Prodigiosenes:

Synthesis and Anticancer Properties. Chem. Med. Chem, 4: 742-745, 2009.

DIAZ-RUIZ.; MONTANER, B.P.; PÉREZ-TOMÁZ, R. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. Nature Reviews Microbiology, 4: 887-899, 2001.

DUTHIE, S.J.; MA, A.; ROSS, A.R.; COLLINS, A.R. Antioxidant Supplementation Decreases Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes. Cancer research, 1291-1295, 1996.

ELAHIAN, F.; MOGHIMI, B.; DINMOHAMMADI, F.; GHAMGHAMI, M.; HAMIDI, M.; MIRZAEI, S.A. The anticancer gene Prodigiosin is not a multidrug resistance protein substrate. DNA and Cell Biology, 32(3): 90-97, 2013.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. Am J Clin Nutri. 57(5): 779-785, 1993.

FACINA, T. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil, 2012.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.J.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive. Mutation Research, 339: 37-59, 1995.

FENDER, J.E.; BENDER, C.M.; STELLA, N.A.; LARH, R.M.; KALIVOD, E.J.; SHANKS, R.M.J. Serratia marcescens Quinoprotein Glucose Dehydrogenase Activity Mediates Medium Acidification and Inhibition of Prodigiosin Production by Glucose. Applied and Environmental Microbiology, 78: 6225–6235, 2008.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. Michael Fenech. Mutation Research 600: 58–66, 2006.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Research/ Environmental Mutagenesis and Related subjects, 147 (1): 29-36, 1985.

FINERAN, P.C.; EVERSON, L.; SLATER, H.; GEORGE, P.C.S. A GntR family transcriptional regulator (PigT) controls gluconate-mediated repression and defines a new, independent pathway for regulation of the tripyrrole antibiotic, prodigiosin, in Serratia.. Microbiology December, 151 (12): 3833-3845, 2005.

FOYE, W.O.; SENGUPTA, S.K. Principles of Medicinal Chemistry. 822-845, 1996

GIRI A, ANANDKUMAR G, MUTHUKUMARAN G, PENNATHUR. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from Serratia marcescens isolated from soil. BMC Microbiology. 4,11, 2004.

GONÇALVES, M.; PINHEIRO, R. L.; MOREIRA, L.K.A. Study cytotoxicity, inflammation and oxidative stress in neutrophils of patients with sickle cell disease : the influence treatment with hydroxyurea. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal do Ceará, 2013.

GONZALES, L.; SANDERSON, B.J.S.; VOLDERS, M.K. Adaptations of the *in vitro* MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis*, 26 (1): 185-191, 2011.

GRIMONT, F AND GRIMONT, P.A.D. The genus *Serratia*. Springer, 219-244, 2006.

HADNAGY, W AND SEEMAYER, N.H. Cytotoxic and genotoxic effects of extract of particulate emission from a gasoline-powered engine. *Environ. Mol. Mutagen*, 12: 385–396, 1998.

HAGMAR, L.; STROMBERG, U.; TINNERBERG, H.; MIKOCZY, Z. The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **204**, (1): 43–47, 2001.

HAN, S.B.; PARK, S.H.; JEON, Y.J.; KIM, Y.K.; KIM, H.M.; YANG, K.H. Prodigiosin Blocks T Cell Activation by Inhibiting Interleukin-2R Expression and Delays Progression of Autoimmune Diabetes and Collagen-Induced Arthritis. *JPET*. 299(2): 415-425, 2009.

HANS, F.S AND DUNN, B.P. Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. *International Journal of Cancer*, 38 (5): 713–717, 1986.

HARRIS, A.K.P.; WILLIAMSON, N.R.; SLATER, H.; COX, A.; ABBASI, S.; FOULDS, I.; SIMONSEN, H.; LEEPER, F.J.; SALMOND, G.P.C. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology*, 150 (11): 3547-3560, 2004.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 123: 161–118, 1983.

HEJAZI, A AND FALKINER, F.R. *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol*, 46 (11): 903-912, 1997.

HO, T.F.; MA, C.J.; LU, Y.T.; TSAI, Y.T.; WEI, Y.H, CAHNG, J.L.; LAI, J.K.; CHEUB, P.J.; YEH, C.T.; TANG, P.C.; , CAHANG, J.T.; KO, J.L.; LIU, F.S.; g Liu, YEN, H.E.; CHANG, C.C. Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicol Appl Pharmacol*, 225 (3):318-28, 2007.

HO, T.F.; PENG, Y.T.; CHUANG, S.M.; LIN, S.C.; FENG, B.L.; LU, C.H.; YU, W.J.; CHANG, J.S.; CHANG, C.C. Prodigiosin down-regulates survivin to facilitate paclitaxel sensitization in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235: 253- 26, 2009.

HOLLEY, J. P.; MATHER, A.; WHEELHOUSE, R. T.; CULLINS, P. M.; HARTLEY, J. A.; BINGHAM, J. P.; COHEN, G. M. *Cancer Res*, 52: 4190, 1992.

HOUDT, R.V.; GIVSKOV, M.; MICHIELS, C.W. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS*

Microbiology Reviews, 31 (4): 407–424, 2007.

HUBER, R.; BAUCHINGER, M. Development and Perspectives of the Human Lymphocyte Micronucleus Assay. *Advances in Mutagenesis Research*, 1: 89-104, 1990.

IERZ, J.D.; IEHL, A.S.D.; ROLLA, J.C.P.; URTADO, C.D.F.; URTADO, A.D.F. Pesquisade micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Revista Ass Med Brasil*, 46(3): 207-11, 2000.

INCA, Insituto Naciocional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2003.

JOHANNES, L.B. Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res*, 49: 4682-4689, 1989.

JONES, R.N.; SADER, H.S.; FRITSCH, T.R. Comparative activity of doripenem and three other carbapenems tested against Gram-negative bacilli with various β -lactamase resistance mechanisms. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 52 (1): 71-74, 2005.

KALIVODA, E.J.; STELLA, N.A.; ASTON, M.A.; FENDER, J.E.; THOMPSON, P.P.; KOWALSKI, R.P.; SHANKS, R.M.Q.; CAMPBELL, C.T. Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Research in Microbiology*, 161(2): 158–167, 2010.

KHANAFARI, Anita; ASSADI, Mahnaz M.; FAKHR, Fatemeh A. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, v. 6, n. 1, p. 1, 2006.

KIM, D.; LEE, J.S.; PARK, Y.K.; KIM, J.F.; JEONG, H.; OH, T.K.; KIM, B.S.; LEE, C.H. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 937–944, 2007.

KIM, S. J et al. Mutant selection of *Hahella chejuensis* KCTC 2396 and statistical optimization of medium components for prodigiosin yield-up. *The Journal of Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 183-188, 2008.

KSAPRZAK, K. S. DNA deaminating ability and genotoxicity. *Chem. Res. Toxicol*, 4 : 604-612, 1991.

LAND, H.; PARADA, L.F.; WEINBERG, R.A. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 18: 771-778, 1983.

LIU, R.; CUI, C.B.; GU, Q.Q.; ZHU, W.M. Potent *in Vitro* anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. *Archives of Pharmacal Research*, 28 (12): 1341-1344, 2005.

MACHADO, A. E. D.; *Quim. Nova*, 23, 237, 2000.

MARAGAKIS, L.L.; WINKLER, A.; TUCKER, M.G.; COSGROVE, S.E.; ROSS, T.B.S.; LAWSON, E.; CAROLL, K.C.; PERL, T.M. *Serratia marcescens* Infection in a Neonatal Intensive Care Unit, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29 (5): 418-423, 2008.

MAZZAFERRI, E.L.; ROBBINS, R.J.; SPENCER, C.A.; BRAVERMAN, L.E.; PACINI, F.; WARTOFSKY, L.; HAUGEN, B.R.; SHERMAN, S.I.; COOPER, D.S.; BRAUNSTEIN, G.D.; LEE, S.; DAVIES, T.F.; ARAFAH, B.M. A Consensus Report of the Role of Serum Thyroglobulin as a Monitoring Method for Low-Risk Patients. *The Journal of endocrinology and metabolismo*, 2012.

MONTANER, Beatriz et al. DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicological Sciences*, v. 85, n. 2, p. 870-879, 2005.

MURAD A.M.; Katz, A.; *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*; Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41, 2003.

NAKASHIMA, Takuji et al. Characterization of bacterium isolated from the sediment at coastal area of Omura bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolate. *Microbiology and immunology*, v. 49, n. 5, p. 407-415, 2005.

NAKASHIMA, Takuji et al. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium γ -proteobacterium. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 73, n. 3, p. 684-690, 2006.

NICHELE, M.I. A representação do câncer pelo discurso do experienciador. *Revista uniabeu*. 2012.

NORPPA, H AND FALCK, C.M. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18(3): 221–233, 2003.

OUTSCHOORN-MARTINEZ, U.; SOTGIA, F.; LISANTI, M.P. Power Surge: Supporting Cells “Fuel” Cancer Cell Mitochondria. *Cell Metabolism*, 15(1): 4-5, 2012.

PACHECO, A.O AND HACKEL, C. Chromosome instability induced by agrochemicals among farm workers in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 18(6):1675-1683, 2002.

PÉREZ-TOMÁZ, R AND VIÑAS, M. New Insights on the Antitumoral Properties of Prodiginines. *Current Medicinal Chemistry*, 17: 2222-2231, 2010.

PIACENTINI, A.B.; MENEZES, H. Recentes aspectos sobre a biologia do câncer e das mutástases. *Rev. Saúde e pesquisa*, 5, 2012.

PINHO, D.S.; RESTANI, R.G.; OLIVEIRA, G.R.; GARCIAS, G.L.; MARTINHPROTT, M.G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da Aloe vera em teste de Allium cepa e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*,

20(3): 409-415, 2010.

POLLÁN, R.R.; GUEVARA-LOPÉZ, M.A.; SUÁREZ-ORTEGA, C.; DÍAZ-HERRERO, G.; FRANCO-VALIENTE, J.M.; RUBIO-DEL-SOLAR, M.; GONZÁLEZ-DE POSADA, N.; VAZ, M.A.P.; LOUREIRO, J.; RAMOS, I. Discovering Mammography-based Machine Learning Classifiers for Breast Cancer Diagnosis. *Journal of Medical Systems*, 36 (4): 2259-2269, 2012.

PYATILAKE, C.J.; MACALUSO, M.; HINE, R.J.; VINTER, D.W.; RICHARDS, E.; KRUMDIECK, C.L. Cigarette smoking, intracellular vitamin deficiency and occurrence of micronuclei in epithelial cells of the buccal mucosa. *Cancer Epidemiol. Biomarkers*, 4: 751-758, 1995.

RAMALHO, Adriana T.; CURADO, M. P.; NATARAJAN, A. T. Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 331, n. 1, p. 47-54, 1995.

REGOURD, J.; ALI, A.S.A.; THOMPSON, A. Synthesis and Anti-Cancer Activity of C-Ring-Functionalized Prodigiosin Analogues. *Canada J. Med. Chem*, 50 (7), 1528-1536, 2007.

RODRIGUES, R.; SALES, C.A. Aspectos epidemiológicos e diagnósticos do carcinoma prostático. *Revista Saúde e Pesquisa*, 6 (1): 131-140, 2013.

RUIZ-SÁNCHEZ, A.; CRUZ-CAMARILLO, R.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BARBOSA-CORONA, J.E. Chitinases from *Serratia marcescens* Nima. *Biotechnology Letters*, 27 (9): 649-653, 2005.

SALMON, S. E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. (Ed.) *Farmacologia básica e clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003. cap. 55, p. 803-832.

SARVIKIVI, E.; LYYTIKAINEN, O.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; LUUKKAINEN, P.; TARKKA, E.; SAXEN, H. *Serratia marcescens* Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 25, (9):723-729, 2004.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A.; Cancer statistics 2012. *Cancer*, 2012.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A.; Cancer statistics 2012. *Cancer*, 2013.

SLATER, H.; CROW, M.; EVERSON, L.; SALMOND, G.P.C. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Molecular Microbiology*, 47 (2): 303-320, January 2007.

SPADACIO, C E BARROS, N. F. Use of complementary and alternative medicine by cancer patients: systematic review. *Rev Saúde Pública*, 42(1): 158-64, 2008.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCH, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim. Nova*, 25 (5): 801-807, 2002.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1): 184–191, 1988.

SPADACIO, C.; CASTELLANOS, M.E.P.; BARROS, N.F.; ALEGRE, S.M.; TOVEY, P.; BROOM, A. Complementary and Alternative Medicines: a meta-synthesis. *Cad. Saúde Pública*, 26(1):7-13, 2010.

SOMEYA, Nobutaka et al. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, v. 67, n. 4, p. 312-317, 2001.

SUDHEER, A.R.; MUTHUKUMARAN, S.; DEVIPRIYA, N.; DEVARAJ, H.; MENON, V.P. Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to *N*-acetylcysteine. *Toxicology*, 243 (3): 317–329, 2008.

SYDOR, P.K. Elucidation of the Prodiginine Biosynthetic Pathway in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299 (2):415–425, 2001.

SOTO-CERRATO, V.; LLAGOSTER, E.; MONTANER, B.; SCHEFFER, G.L.; PEREZ-TOMAZ, R. Mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin. *Biochemical Pharmacology*, 68 (7),1345–1352, 2004.

TAMURA, T.; KURACHI, M.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Apoptosis-Mediated Cytotoxicity of Prodigiosin-Like Red Pigment Produced by γ -Proteobacterium and Its Multiple Bioactivities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28 (12): 2289-2295, 2005.

TANG, J.; YANG, C.; ZHOU, L.; MA, F.; LIU, S.; WEI, S.; ZHOU, J.; ZHOU, Y. Studies on the binding behavior of prodigiosin with bovine hemoglobin by multi-spectroscopic techniques. *Integr Cancer Ther September*, 5 (3): 232-235, 2006.

TARIG, A.G AND PRABAKARAN, P. Molecular characterization of psychotrophic *Serratia marcescens* Apple Garden at Badran kashmir. *Research Journal Agriculture and Biological science*, 6(3): 364-369, 2010.

TAYLOR, G AND KEANE, P.M. Cross-infection with *Serratia marcescens*. *J. Clin. Pathol*, 15: 145-147, 1962.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, T.F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206 –221, 2000.

THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 18 (2): 187-194, 2003.

TRAVALLI, S.; REISS, K.; FEBER, A.; PETRALIA, S.; MERCER, W.E.; CALABRETTA, B.; BASERGA, R. Constitutively expressed c-myc abrogates the requirement for insulinlike growth factor 1 in 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol*, 11(2): 731-736, 1991.

TONETO, M.G.; SEHN, A.A.; LISOT, B.C. History of gastric cancer treatment: the pioneers, early misconceptions and the current guidelines. *Scientia Medica*, 22 (4): 216-223, 2012.

TOVEY, P. B.A.; BARROS, N.F.; HOEHNE, E.L.; CARVALHEIRA, J.B.C. Use of Traditional Medicine and Globalized Complementary and Alternative Medicine Among Low-Income Cancer Service Users in Brazil . *Integr Cancer*, 5 (3): 232-235, 2006.

WILLIAMSON, P.C.; FINERAN, F. J.; LEEPER, G.; SALMOND, P.C.; NEIL R. The biosynthesis and regulation of bacterial prodigiosin. *Nature Reviews Microbiology*, 4:887-899, 2006.

VILLARI, P.; CRISPINO, M.; SALVADORI, A.; SCARELLA, A. Molecular Epidemiology of an Outbreak of *Serratia marcescens* in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22(10): 630-634, 2010.

VRIES, J.J.C.; BAAS, W.H.; PLOEG, K.V.D.; HEESINK, A.; DEGENER, J.E.; ARENDS, J.P. *Serratia marcescens* Colonization and Infection Traced to a Healthcare Worker With Long-Term Carriage on the Hands, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27(11): 1153-1158, 2010.

VOLDERS- KRISCH, M.; SOFUNI, T.; ARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; LORGE, E.; NORPPA, H.; SURRALLE, J.; HUDE, W.V.; WAKATA, A. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:167–172, 2000.

VOLPATO, L.E.R.; SILVA, C.T.; OLIVEIRA, T.M.; SAKAI, T. V.; MACHADO, M.A.M. Radiation therapy and chemotherapy-induced oral mucositis. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 73(4):562-68, 2007.

ZAMBONI, M. Lung cancer in COPD. *Pulmão*, 22(2); 40-44, 2012.

ZAMKOVA, M.; KHROMOVA, N.; KOPNIN, B.P.; KOPNIN, P. Ras-induced ROS upregulation affecting cell proliferation is connected with cell type-specific alterations of HSF1/SESN3/p21Cip1/WAF1 pathways. *Landes bioscience*, 826 – 836, 2013.

ZANDONAI, A.P.; SONOBEN, H.M.; SAWADA, A.O. The dietary risk factors for colorectal cancer related to meat consumption. *Rev Esc Enferm*, 46(1):225-30, 2012.

ZHANG, J.; SHEN, Y.; LIU, J.; WEI, D. Antimetastatic effect of prodigiosin through inhibition

of tumor invasion. *Biochemical Pharmacology*, 69 (3): 407–414,2005.

Capítulo 1

Atividade antimicrobiana da prodigiosina isolada de *Serratia marcerens* UFPEDA 398.

Lapenda, J.C.L.¹; Silva, P.A.²; Sena, K.X.F.R.³; Nascimento, S.C.³

¹ Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Artigo submetido a Revista **World Journal of Microbiology and Biothecnology**.

Autor para correspondência:

¹Jeanne Cristina Lapenda Lins, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife-PE, Brasil.Fone.: 81-2126 8346; (81) 8859 4299. E-mail: jeannecantalice@gmail.com

Atividade antimicrobiana da prodigiosina isolada de *Serratia marcescens* UFPEDA 398.

Lapenda, J.C.L.¹; Silva, P.A.²; Sena, K.X.F.R.³; Nascimento, S.C.³

¹ Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

RESUMO

A prodigiosina, pigmento vermelho natural, é um alcaloide produzido por *Serratia marcescens*. Este metabólito secundário pertence à família das prodigininas cujos pigmentos apresentam em sua estrutura química três anéis pirrólicos. A prodigiosina tem sido descrita pelas suas inúmeras atividades biológicas como antimicrobiana, antimalarial, antitumoral e indutor de apoptose em linfócitos T e B. Por isto, tem despertado o interesse das diversas áreas como médica, farmacêutica, industrial e ambiental. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana da prodigiosina produzida por *S. marcescens* UFPEDA 398 frente a linhagens de micro-organismos teste. O pigmento vermelho produzido por *S. marcescens* UFPEDA 398 apresentou espectro de absorção em 534 nm, valor de referência de 0,59 e peso molecular de 323 m/z, confirmando ser a prodigiosina purificada. A atividade antimicrobiana da prodigiosina foi avaliada pelo método de difusão e disco e pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB). Os testes de difusão em discos demonstraram significativos halos inibitórios para *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01 (35 ± 0.6), *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 (22 ± 1.0) e *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07 (14 ± 0.6). Contudo, apresentaram resistência a prodigiosina *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39 e *Acinetobacter* sp UFPEDA 994, onde não foram observadas formação de halos inibitórios significativos. Foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e bactericida (CBM) para 20 linhagens de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (ORSA). O antibiótico padrão foi a oxacilina. As CMI's observadas variaram de 1 a 4,0 µg / mL enquanto as CMB's variaram de 2 a 16 µg / mL. Neste sentido, com base nos dados encontrados neste trabalho, a prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* UFPEDA 398 apresentou efeito bacteriostático e bactericida demonstrando uma promissora atividade antimicrobiana e sugerindo estudos futuros quanto a sua aplicabilidade nas terapias dirigidas a cepas de *S. aureus* ORSA.

Palavras-chaves: *Serratia marcescens*; Produtos naturais; Resistência bacteriana.

Introdução

A prodigiosina é um metabólito secundário produzido por *Serratia marcescens*. Este é um alcaloide pertencente à classe dos pigmentos vermelhos cujos membros apresentam como característica comum em sua estrutura química um dos anéis pirrólicos. A produção deste metabólito, vermelho natural, é observada por micro-organismos gram-positivos e gram-negativos como *Pseudoalteromonas* sp, *Haella chejuensis*, *Vibrio* sp, *Streptomyces coelicor* e *Serratia marcescens*. Contudo este último micro-organismo destaca-se por apresentar uma maior capacidade de biossíntese do pigmento (Giri et al., 2004; Lapenda et al., 2013).

Estudos relacionados à produção da prodigiosina tem crescido nos últimos anos, uma vez que têm sido atribuídas a este pigmento algumas atividades biológicas como: antitumorais, antifúngicas e antimicrobianas despertando assim o interesse em diversas áreas como médica, industrial, farmacêutica e ambiental. Este pigmento vermelho já vem sendo aplicado nas indústrias têxteis e de polímeros. Devido ao seu potencial antitumoral as indústrias farmacêuticas tem proposto a prodigiosina sintética (Sigma Aldrich, CAS Número 56144-17-3), como uma promissora droga antitumoral (Arthaud et al., 2012; Guryanov et al., 2013).

Os produtos naturais, têm sido utilizados pelas indústrias farmacêuticas como um novo conceito de substâncias com promissoras atividades antimicrobianas observadas como alternativas ao uso dos antibióticos convencionais. A sensibilidade à prodigiosina observada para o micro-organismo *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (ORSA) é um exemplo da efetiva ação destes produtos naturais (Hemaiswarya e Kruthiventi, 2008).

O aumento das infecções hospitalares induzidas por este micro-organismo tem sido observado a cada ano devido a sua resistência aos antimicrobianos convencionais de atividade antiestafilocócica como os aminoglicosídeos, cloranfenicol, lincosamídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina. Por conseguinte um dos glicopeptídeos, principalmente à

vancomicina, é uma das poucas alternativas terapêuticas eficaz no tratamento de infecções causadas por cepas ORSAS (Bell e Turnidge, 2002).

Neste sentido, conforme o descrito sobre as propriedades antimicrobianas promissoras da prodigiosina, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana deste metabólito secundário isolado de *S. marcescens* frente a diferentes micro-organismos.

Material e método

Micro-organismos e condições de cultura

Os micro-organismos utilizados nos testes (tabela 1) foram *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07 e *Acinetobacter* sp UFPEDA 994. Foram estudados também a atividade antimicrobiana da prodigiosina frente a vinte (20) isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (ORSA) provenientes do Laboratório de Cultura e Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos, na Universidade Federal de Pernambuco (tabela 2). Todos os micro-organismos, acima citados foram mantidos sobre refrigeração a 4 °C em meio Ágar Müller Hinton (Himedia), com exceção do *S. pyogenes*, mantido em Ágar Sangue.

Tabela 1. Micro-organismos empregados no teste de difusão em disco

Micro-organismos	Méio de cultura	Temperatura
<i>Escherichia coli</i> UFPEDA 224	Ágar Müeller Hinton	4°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 39	Ágar Müeller Hinton	4°C
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 01	Ágar Müeller Hinton	4°C
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPE 138	Ágar Müeller Hinton	4°C
<i>Streptococcus pyogenes</i> UFPE 07	Ágar Sangue	4°C
<i>Acinetobacter</i> sp UFPE 994	Ágar Müeller Hinton	4°C

Produção da prodigiosina

S. marcescens UFPEDA 398 foi cultivada em Erlenmyers (250 mL) contendo 100 mL do meio caldo nutriente (Difco), (10 g de peptona; 5 g de NaCl e 3 g/L de extrato de levedura), em seguida incubados a 30 °C, a 150 rpm por 16 horas (*overnight*), até a obtenção de uma densidade ótica de dois ($OD_{600} = 2$, correspondendo a 10^6 cel/ mL). Os processos fermentativos para produção da prodigiosina foram realizados segundo Vendruscolor et al., (2007), em estado sólido visando o máximo rendimento do pigmento sintetizado em mg. O inóculo bacteriano, previamente preparado, foi transferido (1 mL) para placas contendo o meio da Difco o Ágar Manitol (5 g/ L de peptona, 2 g/L de extrato de levedura, 20 g/ L de manitol e 17 g/ L de ágar bacteriológico). O pH final do meio foi ajustado para sete (pH = 7), conforme descrito por Giri et al., (2004). Em seguida, as placas foram incubadas por 48 horas a temperatura de 30 °C e após o tempo transcorrido foi observada a produção da prodigiosina.

Extração da prodigiosina

O pigmento foi extraído a partir da biomassa bacteriana produzida em 48 horas em meio sólido (Casullo, et al., 2010). A biomassa bacteriana foi removida delicadamente da superfície da placa de Petri, em seguida o pigmento foi extraído pelo sistema de solvente clorofórmio: metanol nas proporções (2:1; 1:1 e 1:2 v/v) e 100% de metanol. As frações obtidas foram reunidas e concentradas por rotaevaporação à temperatura de 45 °C, sendo o extrato de prodigiosina obtido segundo Nakashima et al., (2005 e 2006).

Isolamento e purificação da prodigiosina

O Extrato de prodigiosina foi solubilizado em 3 mL de metanol conforme Nakashima et al., (2006), e submetido à cromatografia em coluna -TLC (coluna 22 x 1 cm), usando sílica gel (Merck) como adsorvente. A eluição foi feita pelo sistema de solvente clorofórmio: metanol: ácido acético (5: 30: 65 v/v) e em seguida, modificado para clorofórmio : metanol : acetona (4: 2: 3 v/v), visando a máxima remoção de impurezas. As frações coletadas posteriormente, foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) para determinação do valor de referencia (R_f) das amostras e indentificação. O valor de referência da amostra foi calculado segundo a fórmula ($R_f = ds / dm$) com base nas distâncias percorridas pelo solvente (ds) e do soluto (dm) segundo Chaves et al., (1997). As amostras foram aplicadas sobre folhas de alumínio revestidas por sílica gel, em seguida colocadas em cubas de vidro contendo o sistema de solvente metanol: clorofórmio: acetona (2:3: 4 v/v). O valor de referência da amostra foi comparado com o R_f da prodigiosina padrão (Sigma).

Caracterização da prodigiosina

A caracterização da fração vermelha isolada foi analisada por espectrofotometria (UV) sendo determinada a faixa de absorbância no intervalo de 200 a 700 nm. Em seguida, o peso molecular da amostra foi determinado por espectrometria de massa e carga (GCMS). Os dados obtidos pós análise do peso molecular foram comparados com valores de massa registrados na biblioteca computadorizada de valores m/z e confrontados com a literatura (Jeong et al., 2005; Davaraj et al., 2009).

Atividade antimicrobiana da prodigiosina (Teste de Difusão em Disco)

A atividade antimicrobiana da prodigiosina foi determinada frente às linhagens *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07 e *Acinetobacter* sp UFPEDA 994, segundo o método de difusão em disco (Kirby-Bauer, 1966). Os testes foram realizados em triplicatas e os antibióticos padrões utilizados foram ampicilina (10 µg), cloranfenicol (10 µg) e gentamicina (10 µg). As linhagens foram semeadas em placas seguindo o padrão de turbidez da escala de Mac Farland (0,5). Os discos impregnados com 300 µg de prodigiosina foram adicionados em placas com meio Müller Hinton previamente semeadas com as respectivas culturas de micro-organismos. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, as áreas de inibição observadas ao redor dos discos foram medidas (mm) considerando apenas halos maiores que seis milímetros.

Concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB)

A CMI e CMB foram mensuradas segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* pelo método de microdiluição em caldo Müeller Hinton (CLSI, 2010). Inicialmente foram preparados inoculos ($1,5 \times 10^8$ UFC/ mL) com suspensão de 0,5 segundo a escala de McFarland a partir de colônias bacterianas com 24 horas de cultivo. Vinte (20) isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (ORSA) foram testados frente à prodigiosina. A oxacilina foi utilizada como antibiótico padrão na concentração de 1280 – 0,25 µg/mL para comprovar que as cepas eram ORSA. Em microplaca de 96 poços foram distribuídos 100 µL de Caldo Mueller Hinton, 10 µL da suspensão bacteriana padronizada e 20 µL da solução mãe de prodigiosina (1280 – 0,25 µg/ mL), em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Transcorrido o tempo de incubação, foram adicionados 20 µL da substância reveladora (0,01 % Resarsurina) e em seguida, incubando por 2 horas. Após este período as placas foram observadas considerando o último poço onde não houve crescimento visível (na coloração azul) como sendo a CMI. A determinação da CMB foi feita a partir do semeio por esgotamento em placa contendo Ágar Müller Hinton do último poço de menor concentração onde não houve crescimento até o de maior concentração.

Resultados

Prodigiosina: produção, purificação e caracterização

O rendimento de biomassa obtida em 48 horas de cultivo em meio manitol foi de 40.5 g/L em Ágar Manitol (Figura 1). A quantificação do máximo rendimento da prodigiosina foi estabelecida a partir da correlação com a biomassa produzida, sendo observado máximo rendimento da fração vermelha de 1.2 g / g de biomassa e o rendimento de prodigiosina de 360

mg/g de pigmento. Durante o processo de purificação foi observado uma fração roxa, que foi separada, obtendo um rendimento de 120 mg/g de pigmento (tabela 2). Após a caracterização química por GCMS o pigmento roxo apresentou peso molecular correspondente a 207.

Tabela 2. Produção de prodigiosina por *S. marcescens* UFPEDA 398 em meio ágar manitol após 48 horas de cultura a 30 °C.

Meio sólido	Biomassa (g/L)	Fração vermelha (g/g de biomassa)	Fração roxo (mg/g de pigmento)	Prodigiosina (mg/g de pigmento)
Manitol	40.50	1.2	120	360

O pigmento vermelho e roxo tiveram seus valores de referências (*R_f*) determinado por cromatografia em camada delgada CCD, sendo obtido para a fração vermelha o *R_f* de 0.59 e para a roxa de 0.22 respectivamente. O pigmento vermelho apresentou absorbância máxima em 534.40 nm e a fração roxa em 272.65 nm (Figura 2) e o peso molecular de 323 encontrado para a fração vermelha (Figura 3) e de 207 para a fração roxa (Figura 4).

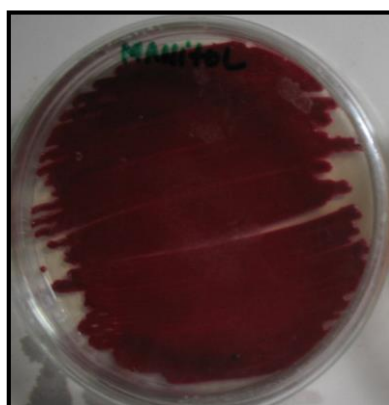


Figura 1. Aspecto macroscópico de *S. marcescens* UFPEDA 398 em meio Ágar Manitol em 48 horas de cultivo, sendo observado a produção de pigmento vermelho.

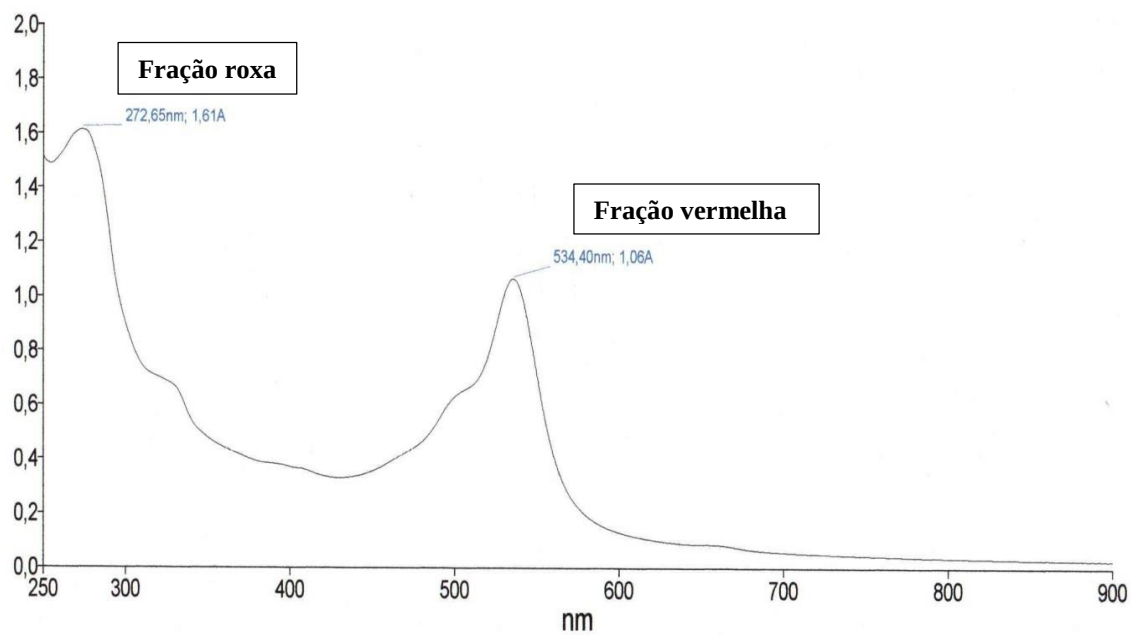


Figura 2. Espectrofotometria UV-vis da fração roxa e vermelha com absorbância máxima em 272.65 e 534.40 nm respectivamente.

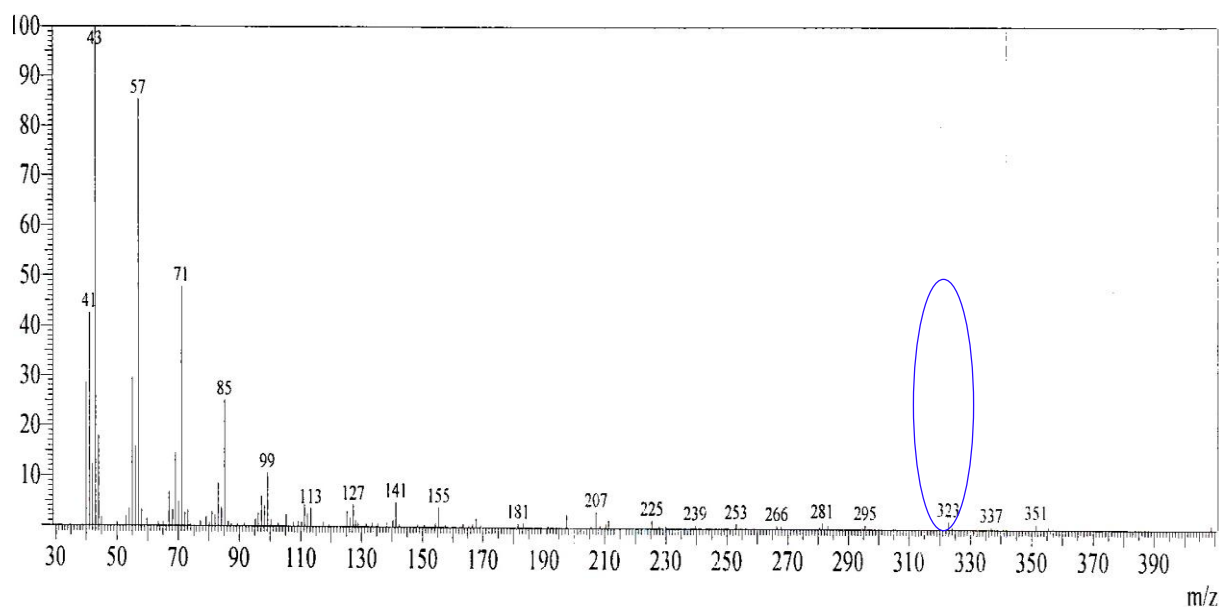


Figura 3. Espectrometria de massa da fração vermelha (prodigiosina) produzida por *S. marcescens* UFPEDA 398.

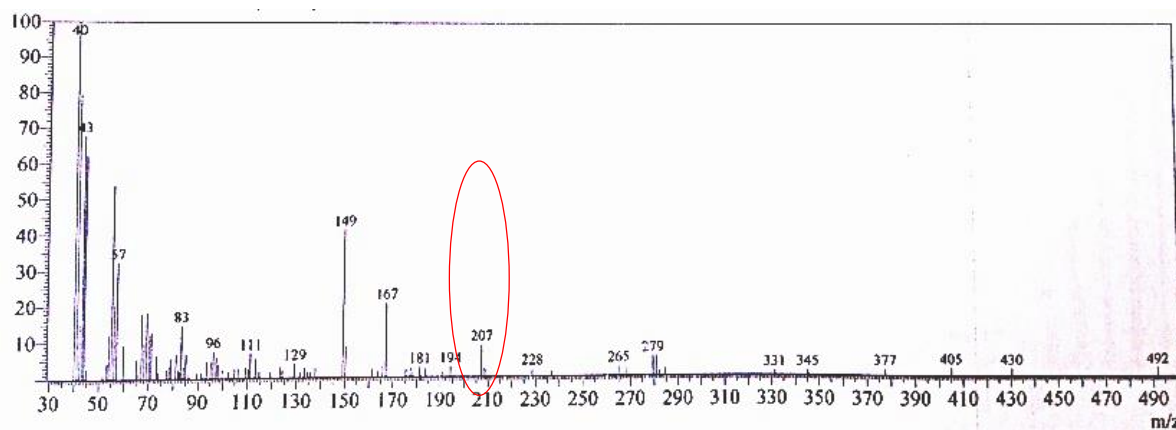


Figura 4. Espectrometria de massa da fração roxa (monopirrol) produzida por *S. marcescens* UFPEDA 398.

Atividade antimicrobiana da prodigiosina (Teste de Difusão em Disco)

Os dados obtidos para a atividade antimicrobiana em teste de difusão em disco encontram-se na tabela 3. Apresentaram sensibilidade a prodigiosina as cepas de *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01 (35 ± 0.6), *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 (22 ± 1.0) e *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07 (14 ± 0.6) com halos significativos (Figura 5). Em adicional, *S. aureus* UFPEDA 01 destacou-se por apresentar maior sensibilidade a prodigiosina quando comparado com os antibióticos padrões testados. Foi evidenciada também atividade antimicrobiana da fração roxa frente a *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39 (14.5 ± 0.5) e *E. faecalis* UFPEDA 138 (13.5 ± 0.5). Os micro-organismos resistentes a prodigiosina foram *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39 e *Acinetobacter* sp UFPEDA 994, que não apresentaram halos de inibição significativos ao redor dos discos.

Tabela 3 Atividade antimicrobiana (mm) da prodigiosina detectada no Teste de difusão em disco (Kirby-Bauer, 1966).

MICRO-ORGANISMOS	FRAÇÃO ROXA (Média / mm)	PRODIGIOSINA (Média / mm)	ANTIBIÓTICOS (Média/ mm)			DMSO (Média/ mm)
			Amp	Cl	Gnt	
<i>Escherichia coli</i> UFPEDA 224	—	-----	26.0 ± 0.0	30.0 ± 0.0	20.0 ± 0.0	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 39	14.5 ± 0.5	-----	-----	11.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	--
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 01	—	35.0 ± 0.6	43.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	26.0 ± 0.0	--
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA138	13.5 ± 0.5	22.0 ± 1.0	32.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	12.0 ± 0.0	--
<i>Streptococcus pyogenes</i> UFPEDA07	—	14.0 ± 0.6	40.0 ± 0.0	31.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	--
<i>Acinetobacter</i> sp UFPEDA994	—	-----	-----	17.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	--

*Ampicilina (Amp); Clorafenicol-(Cl) e Gentamicina (Gnt)

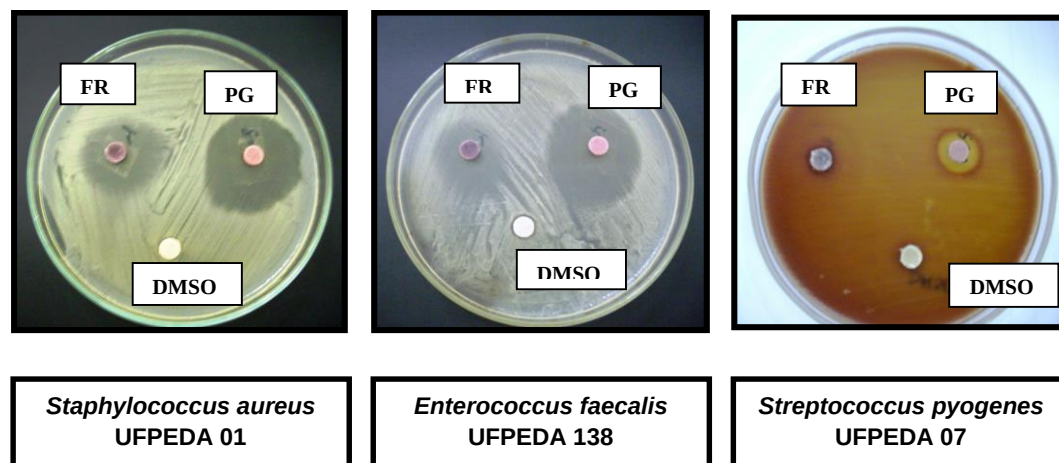


Figura 5. Atividade antimicrobiana da fração roxa (FR) e prodigiosina (PG) frente aos micro-organismos testes em 24 horas de cultivo (Teste de difusão em disco).

Concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB)

Os resultados para concentração mínima inibitória (CMI) da prodigiosina frente aos 20 isolados clínicos ORSA encontram-se reunidos na tabela 4. Foram observadas CMI's que variaram de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$. As CMB's apresentaram valores iguais ou maiores que 2.0 $\mu\text{g/mL}$ como pode ser observado na linhagem de *Staphylococcus aureus* 25 (4.0 $\mu\text{g/mL}$ - secreção de ferida), linhagem *S. aureus* 39 (4.0 $\mu\text{g/mL}$ – ponta de catéter), linhagem de *S. aureus* 629 (8.0 $\mu\text{g/mL}$ - isolada de urocultura) e linhagem *S. aureus* 73 (16 $\mu\text{g/mL}$ - secreção de ferida) cujas as CMB's encontradas apresentaram concentrações mais elevadas para a prodigiosina (Figura 6). Os dados obtidos demonstram que as cepas ORSA apresentam sensibilidade a prodigiosina sendo observado efeito inibitório do micro-organismo até mesmo nas CMI's de concentrações mais baixas (1 $\mu\text{g/mL}$). Isto sugere a ação efetiva da prodigiosina quando comparada com a oxacilina cuja menor CMI encontrada foi igual ou acima de 128 $\mu\text{g/mL}$ com exceção a linhagem 81 (16 $\mu\text{g/mL}$ – isolado de urina). Foram consideradas as cepas resistentes a oxacilina quando mensurados valores de IMC superiores ou iguais a 128 $\mu\text{g/mL}$.

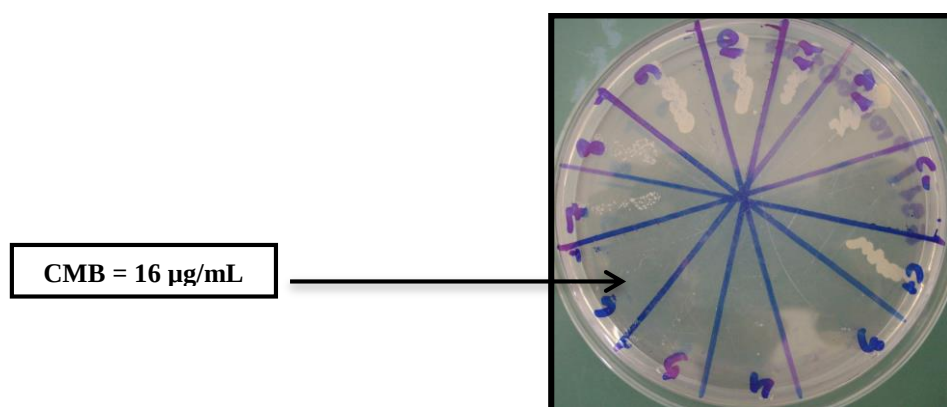


Figura 6. Determinação da CMB para prodigiosina frente a *S. aureus* 73 resistente a oxacilina sendo observada desde a maior concentração de prodigiosina (nº3) até a menor concentração (nº12) em 24 horas de cultura.

Tabela 4. Concentração mínima inibitória e bactericida (CMI) e (CMB) da prodigiosina frente a linhagens de *S.aureus* ORSA após 24 horas de cultura.

Micro-organismos	Amostras	Prodigiosina		Oxacilina	
		*CMI	**CMB	CMI	CMB
		(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
<i>S. aureus</i> UFPEDA 18	Urina	1.0	2.0	>128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 20	Sangue	1.0	2.0	>128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 25	Secreção de ferida	2.0	4.0	128	128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 26	Ponta de cateter	1.0	2.0	128	128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 39	Ponta de cateter	2.0	4.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 53	Ferida pós-operatória	1.0	2.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 55	Secreção traqueal	1.0	2.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 57	Exsudado purulento	1.0	2.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 66	Secreção traqueal	1.0	2.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 73	Secreção de ferida	8.0	16.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 74	Secreção de ferida	1.0	2.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 76	Ponta de cateter	1.0	2.0	16.0	32.0
<i>S. aureus</i> UFPEDA 77	Ferida pós-operatória	1.0	2.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 78	Secreção de ferida	1.0	2.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 79	Secreção de ferida	1,0	2.0	128	>128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 81	Urina	1,0	2.0	8.0	16.0
<i>S.aureus</i> UFPEDA 629	Urocultura	4,0	8.0	128	128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 630	Hemocultura	1,0	2.0	128	128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 676	Secreção de prótese	1,0	2.0	128	128
<i>S. aureus</i> UFPEDA 732	Ponta de cateter	1,0	2.0	128	128

* CMI (concentração mínima inibitória), ** CMB (concentração mínima bactericida),

Discussões

A produção de prodigiosina requer diversos fatores que favoreçam a formulação de um microambiente propício à multiplicação do micro-organismo, *S. marcescens*. De acordo com Ahmed e colaboradores., (2012) podemos citar alguns fatores como meios de cultura compostos por nutrientes essenciais e fonte carbono adequada como o meio manitol e peptona glicerol. Ambos favorecem a síntese da prodigiosina, contudo o manitol tem sido o mais empregado, pois apresenta baixo custo quando comparado com outros meios de cultura convencionais existentes e ainda, por ser rico em fonte de carbono mais simples favorece o máximo rendimento de prodigiosina (360 mg/g de pigmento), o que o torna um diferencial.

De acordo com Giri e colaboradores., (2004) e Silva e colaboradores., (2012), alguns meios alternativos compostos de farinha de amendoim, gergelim, óleos de milho, soja e côco são excelentes substratos para a síntese da prodigiosina visando o máximo rendimento de 300 mg/mL do pigmento. Novos substratos alternativos têm sido descritos como uma alternativa menos dispendiosa, pois são de baixo custo e favorecem a máxima produção de prodigiosina. Quanto a biossíntese da prodigiosina alguns fatores devem ser considerados como a temperatura e o pH que interferem diretamente na produção onde se descreve que a temperatura ótima de produção do pigmento é de 30 °C e o pH ótimo neutro (pH = 7). Baldino e colaboradores., (2006), afirma que a produção do pigmento sofre também interferência da luz, logo são descritos máximo rendimento de prodigiosina em cultivos com total ausência de luz.

O pigmento produzido por *S. marcescens* UFPEDA 398 foi identificado e caracterizado por espectrofotometria UV-vis e espectrofotometria de massa GCMS respectivamente. Segundo Silva e colaboradores., (2012), a substância produzida por *S. marcescens* cujo valor de absorbância é 534 nm e o peso molecular de 323 caracteriza a molécula denominada

prodigiosina. Yang, Fei e colaboradores., (2013) descreve o pigmento vermelho isolado produzido por *Microcystis aeruginosa* como sendo a prodigiosina cujo peso molecular achado foi de 323, semelhante o mesmo obtido para a prodigiosina purificada neste estudo. Observa-se também que o pigmento roxo isolado e caracterizado neste estudo sugere ser o monopirrol (MAP), um dos precursores da prodigiosina, descrito por Sydor e colaboradores., (2001) e Williamson e colaboradores., (2006) cujo peso molecular correspondeu a 207.

A atividade antimicrobiana da prodigiosina foi avaliada, inicialmente, em teste de difusão em disco (Kirby-Bauer., 1996). Foram sensíveis as cepas de *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01 (35 ± 0.6), *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 (22 ± 1.0) e *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07 (14 ± 0.6) com halos significativos. Observou-se que *S. aureus* UFPEDA 01 apresentou maior sensibilidade a prodigiosina quando comparado com os antibióticos padrões testados e ainda que as bactérias mais sensíveis ao pigmento foram as Gram-positivas (*S. aureus* UFPEDA 01 e *E. faecalis* UFPEDA 138), enfatizando a importância dos dados uma vez que, os micro-organismos testados são isolados clínicos com potencial patogenicidade e virulência e ainda, demonstrando a ação antimicrobiana efetiva do pigmento prodigiosina frente a estas cepas em comparação com os antibióticos ampicilina, cloranfenicol e gentamicina avaliados.

Segundo Lee e colaboradores., (2011), os micro-organismos *Salmonella typhimurium* (8,0 mm), *Staphylococcus aureus* (8,8 mm), *Escherichia coli* (8,0 mm), *Bacillus subtilis* (8,4 mm) e *Candida albicans* (8,0 mm) apresentaram significativos halos de sensibilidade a prodigiosina e a cicloprodigiosina. Estes dados corroboram com os obtidos neste trabalho uma vez que, foram observados halos de inibição para os micro-organismos teste e ainda foram observados halos superiores ao descrito por Lee e colaboradores., (2011), demonstrando sensibilidade destas bactérias ao pigmento. Contudo não foi observada atividade antimicrobiana para a cepa de *Escherichia coli*, o que contraria os achados de Lee e colaboradores., (2011). E

ainda, Priya e colaboradores., (2013), demonstra que os micro-organismos *Bacillus subtilis* (8 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (6 mm), *Alteromonas* sp (17 mm) e *Gallionella* sp (11 mm) foram sensíveis a prodigiosina produzida pela *S. marcescens* CMST 07 isolada de um estuário.

Quanto a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bacteriostática (CMB), os resultados obtidos foram bastantes significativos demonstrando a potencial e promissora atividade antimicrobiana da prodigiosina quando comparados o antibiótico padrão.

Coelho e colaboradores., (2013), descreve o perfil de sensibilidade das cepas de *S. aureus* isoladas de animais e humanos frente aos antibióticos ampicilina e gentamicina, onde foi observada maior sensibilidade dos isolados clínicos de humanos. Segundo Abdullateef e colaboradores., (2012), as antibióticos terapias convencionais utilizam a oxacilina em casos de dermatites induzidas por cepas ORSA contudo, são observadas cepas resistentes ao antibiótico.

S. aureus oxacilina resistente tem sido alvo de grandes preocupações em saúde uma vez que, o micro-organismo é causador de frequentes infecções hospitalares e ainda, por apresentar resistência a uma diversidade de antibióticos convencionais apresentando sensibilidade apenas aos antibióticos vancomicina e metilciclina (Alvarez e Mimica, 2012). Em adicional, Santos e colaboradores., (2011), afirma que cepas ORSAS são sensíveis a vancomicina quando observados MIC's inferiores a 4 µg/mL e resistentes quando os MIC's forem maiores que 8 µg/mL. Os dados descritos por Croes et al., (2009), confirmam os descritos anteriormente por Santos et al., (2007), onde foram observadas também CMI's menores que 4 µg/mL para a vancomicina frente aos isolados clínicos ORSA.

Além da atividade antibacteriana observa-se atividade antifúngica para a prodigiosina frente aos fungos dermatófitos de difícil tratamento. Ahmed e Mevart et al., (2012), afirma que a prodigiosina apresentou atividade antifúngica produzindo inibição em esporos de fungos dermatófitos como *Microsporum cookie* (CMI = 2.3 µg/mL), *M. Ajelloi* (CMI = 2.3 µg/mL) e *Trichophyton longfeuseus* (CMI = 8.1 µg/mL).

A prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* UFPEDA 398 apresentou uma promissora atividade antimicrobiana frente aos isolados clínicos quando comparada com antibióticos padrões. Esta informação sugere sua aplicabilidade em antibióticos terapias resultantes de infecções induzidas por cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e antibióticos terapias dirigidas a *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente.

Conclusões

O pigmento vermelho, natural, sintetizado por *Serratia marcescens* UFPEDA 398 foi caracterizado como sendo à prodigiosina reportada na literatura, a qual diversas atividades biológicas têm sido atribuídas, inclusive antimicrobiana. Dentre os isolados clínicos avaliados apresentaram sensibilidade a prodigiosina *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 e *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07 e ainda, as cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente, demonstrando promissora ação antimicrobiana do pigmento frente aos micro-organismos testes. A fração roxa apresentou atividade antimicrobiana apenas para as cepas *Pseudomonas.aeruginosa* UFPEDA 39 e , *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138. Neste sentido pode ser observado que a prodigiosina é um produto natural com significativa atividade antimicrobiana sugerindo em estudos futuros a sua aplicação nas antibióticos terapias dirigidas a *Staphylococcus aureus* ORSA.

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe técnica responsável, ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio físico e estrutural e aos órgãos de fomento fundamentais o a desenvolvimento desta pesquisa, o CNPq e CAPES.

Referências bibliográficas

- Abdullateef A. A; Ahmad A. A. R; Hani A. A. S; Jalal A. B; Mohammad I. A; Ghada B. S. Documentation of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) among children with atopic dermatitis in the Qassim region, Saudi Arabia. *Acta Dermatovenereologica*. 21: 51-53, 2012.
- Ahmed M. A, El-Bondkly, Mervat M. A, El-Gendy, Rasha H Bassyouni. Overproduction and biological activity of prodigiosin-like pigments from recombinant fusant of endophytic marine *Streptomyces* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 102,719–734, 2012.
- Alvarez, P.A and Mimica, M.J. Toxic Shock Syndrome. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*. 2012;57(2):81-4.
- Arthaud, IDB et al. (2012) *Chemistry & biodiversity* 9, p.418–427.
- Baldino C, Parr J, Wilson C, Yohannes D, Wasserman H. Indoloprodigiosins from the C-10 bipyrrrolic precursor: new antiproliferative prodigiosin analogs. *Bioorg Med Chem Lett*.16, 701-704, 2006.
- Bauer, A. M.; Kirby, M. N.; Sherris, J. C et al. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk methods. *Am. J. Clin. Pathol*. 45, 493-494, 1996.
- Bell, Jan M., and John D. Turnidge. "High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998-1999." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46.3 (2002): 879-881.
- Casullo de Araújo, Helvia W., K. Fukushima, and Galba M. Campos Takaki. "Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate." *Molecules* 15.10 (2010): 6931-6940.
- Chaves, M.H.; Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "Química Orgânica". *Química Nova*, v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Document: M100 – S20 Vol. 30 No.1. Replaces M100 – S19 Vol. 19: 3, 2010.
- Croes S; Beisser P.S;Terporten P.H;Neef C;Deurenberg R.Hand Stobberingh E.E. Diminished in vitro antibacterial activity of oxacillin against clinical isolates of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 16: 979–985, 2009.
- Coelho S.M.O,Moraes R.A.M, Soares L.C,Pereira I. A,Gomes I. P, Souza M.M.S. Resistance pattern and detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* from animal and human samples. *Ciência Rural*. 37: 195-200. 2013.

Davaraj N, Dharumaduari D, Noorudin T, Annamalai P. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and its Cytotoxicity activity. *J. Pharmacy Res.* 2, 590-593, 2009.

Giri A, Anandkumar G, Muthukumaran G, Pennathur. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology.* 4,11, 2004.

Guryanov, I. D., Karamova, N. S., Yusupova, D. V., Gnezdilov, O. I., & Koshkarova, L. A. (2013). Bacterial pigment prodigiosin and its genotoxic effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39(1), 106-111.

Hemaiswarya S., Kruthiventi A. e Doble M. "Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases" *Phytomedicine* 15:639- 652, 2008.

Jeong H, Yim H, Lee C, Choi H, Park Y, Yoon S, Hur G, Kang H, Kim D, Lee H, Park K, Park S, Lee K, Kim J. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic Acids Res.* 33, 7066-73, 2005.

Lee J. S, Kim Y .S, Park S, Kim J, Kang S, Lee M, Ryu S, Choi J. M, Tae-Kwang and Yoo J.H. Exceptional Production of both Prodigiosin and Cycloprodigiosin as Major Metabolic Constituents by a Novel Marine Bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4967, 2011.

Lins, JC Lapenda, et al. "Production and toxicological evaluation of Prodigiosin from *Serratia marcescens* UCP/WFCC1549 on Mannitol Solid Medium." *International Journal of Applied Research in Natural Products* 7.2 (2014): 32-38.

Bauer, Kirby. Sherris and Turck, 1966. *Am. J. Clin. Path* 45.493: 2.

Marcelo J. M; Rozane L. C, Eitan N. B, Neiva D and Hélio H. C. F. Comparison of five methods for oxacillin susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* isolates from cystic fibrosis patients. *Rev. Inst. Med. Trop.* 54: 305-306, 2012.

Nakashima T, Kurachi M, Kato Y, Yamaguchi K, Oda T. Characterization of bacterium isolated from the sediment at Coastal area of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolated. *Microbiol. Immunol.* 49, 407-415, 2005.

Nakashima T, Miyazaki Y, Matsuyama Y, Muraoka W, Yamaguchi K, Oda T. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γ-proteobacterium*. *App. Microbiol. Biotechnol.* 73, 684–690, 2006.

Priya, K. Ananda, et al. "Antifouling activity of prodigiosin from estuarine isolate of *Serratia marcescens* CMST 07." *Microbiological research in agroecosystem management*. Springer India, 2013. 11-21.

Santos, André Luis dos, et al. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 43.6, 2007: 413-423.

Santos A.L, Dilvani O.S, Cícero C. F, Bruno L. A. F, Ilídio F. A, Carlos R. R, Helena C. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*. 43 (6): 413-423, 2011.

Silva, R. K. Subha, D. Bhakta, A. R. Ghosh e S. Babu. Characterization and Enhanced Production of Prodigiosin from the Spoiled Coconut. *Appl Biochem Biotechnol* 166, 187–196, 2012.

Schlegel, H. (1998). *Microbiología General*. Editorial Omega, Barcelona. España. 448p.

Shen K, Akoda E and Zhang K. Methicillin- Resistance *Staphylococcus aureus* carriage among students at a historically black university: A case study. *International Journal of Microbiology*. 97:34-40, 2013.

Sydor, P. K., Barry, S. M., Odulate, O. M., Barona-Gomez, F., Haynes, S. W., Corre, C., ... & Challis, G. L. (2011). Regio- and stereodivergent antibiotic oxidative carbocyclizations catalysed by Rieske oxygenase-like enzymes. *Nature chemistry*, 3(5), 388-392.

Vendruscolor F; Fernanda K; Luana de O. P; Jorge L. N. Production of single cell protein from apple pomace using state solid fermentation. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. 01, 53-57, 2007.

Yang F, Wei H. Y, Li X.Q, Li Y.H, Li X. B, Yin L. H, and Pu Y. P. Isolation and Characterization of an Algicidal Bacterium Indigenous to Lake Taihu with a Red Pigment able to Lyse *Microcystis aeruginosa*. *Biomed Environ Sci*. 26, 148-154, 2013.

Yi Wang, Aya N. Kakushi H, Azamjom B, Issey O, Reyiichi A e Keiichi E. Cytotoxic Prodigiosin Family Pigments from *Pseudoalteromonas* sp. 1020R isolated from the Pacific Coast of Japan. *Biosci. Biothechnol. Biochem*. 76, 1229 -1232, 2012.

Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J., & Salmond, G. P. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), 887-899.

Capítulo 2

Citotoxicidade da prodigiosina, pigmento natural, isolado de *Serratia marcescens* UFPEDA 398

Lapenda, J.C.L.¹; Rodrigues, M. D²; Militão, G.C.G³, Valéria Pereira, V.R.A⁴, Castro, M.C.A.B⁴, Adam, M.L⁵, Nascimento, S.C²

¹Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

³Departamento de Fisiologia Renal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

⁴Laboratório de Imunologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife-PE, Brasil.

⁵Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Recife-PE, Brasil.

Artigo a ser submetido a Revista *Cell Biology and Toxicology*.

***Autor para correspondência:**

¹Jeanne Cristina Lapenda Lins, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife-PE, Brasil. Fone.: 81-2126 8346; Ramal: 207 ou (81) 8859 4299.

E-mail: jeannecantalice@gmail.com

Citotoxicidade da prodigiosina, pigmento natural, isolado de *Serratia marcescens* UFPEDA 398

Lapenda, J.C.L.¹; Rodrigues, M. D²; Militão, G.C.G³, Valéria Pereira, V.R.A⁴, Castro, M.C.A.B⁴, Adam, M.L⁵, Nascimento, S.C²

¹Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

³Departamento de Fisiologia Renal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

⁴Laboratório de Imunologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife-PE, Brasil.

⁵Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Recife-PE, Brasil.

Resumo

A prodigiosina é um metabólito secundário, de pigmentação vermelha, produzido por *Serratia marcescens*. O pigmento vermelho é um alcaloide natural cuja a estrutura química apresenta três anéis pirróis. A prodigiosina tem sido descritas por diversas atividades biológicas, inclusive, antitumoral induzindo apoptose em linfócitos T e B. Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade citotóxica da prodigiosina em linhagens de células tumorais NCHI-2, HEp-2, MCF-7 e HL 60. O pigmento vermelho foi isolado a partir da biomassa de *Serratia marcescens* UFPEDA 398 cujas frações foram previamente separadas por cromatografia em coluna, purificadas, identificadas e posteriormente, caracterizadas por GCMS e comparadas com a biblioteca computadorizada de valores em m/z onde o pigmento correspondeu a prodigiosina com máxima absorção em 534 nm, peso molecular 323 e fórmula estrutural C₂₀H₂₅N₃O. Durante o processo de purificação da prodigiosina foi observado também uma fração roxa de absorbância em 272.65 nm. Foram evidenciados significativos efeitos citotóxicos da prodigiosina para as linhagens tumorais NCHI 292, Hep 2, MCF 7 e HL 60. A fração roxa isolada apresentou baixo efeito citotóxico (IC₅₀ 11.3 µg/mL) quando comparado com a prodigiosina (IC₅₀ 3.4 µg/mL) para as linhagem de células tumorais estudadas. A linhagem MCF 7 apresentou leve resistência ao pigmento (IC₅₀ 5.1 µg/mL) sendo portanto, necessários estudos futuros para elucidação dos mecanismos de ação antitumoral da prodigiosina frente as linhagens tumorais a partir dos testes de citometria de fluxo. Contudo, os dados encontrados neste trabalho, demonstraram que a prodigiosina apresentou atividade citotóxica em linhagens de células tumorais sugerindo propriedades antitumorais promissoras. Neste sentido, serão realizados estudos futuros quanto aos efeitos genotóxicos da prodigiosina produzida por *S. marcescens* UFPEDA 398.

Palavras-chave: Prodigiosina. *Serratia marcescens*. Citotoxicidade. Genotoxicidade.

Introdução

Prodigininas representam uma classe de antibióticos oligopirrol pigmentados com alto potencial medicinal como imunossupressores e agentes tumorais (Cerdeno et al., 2001). Estes pigmentos (figura 1) são comumente sintetizados e evidenciados logo após a fase de crescimento exponencial, fase *Log* (Gueryanov et al., 2013). Atualmente, são descritas três classes para estes pigmentos onde a primeira reúne o grupo dos tripirróis lineares, incluindo a prodigiosina cuja síntese pode ser observada em alguns poucos micro-organismos (*Serratia marcescens*, *Hahella chejuensis*, *Pseudomonas magnesorubra* e *Vibrio psychroerythreus*) e undercilprodigiosina (isolado de *Streptomyces longisporus ruber*, *Streptoverticillium rubrireticuli*, *Actinomadura madurae*, *Streptomyces coelicolor* e *Saccharopolyspora* sp). A segunda classe reúne o grupo dos compostos macrocíclicos, caracterizados pela sua formação entre os pirróis A e C, como a cicloprodigiosina isolada de *Actinomadura pelletieri* e *Actinomadura madurae* (Davaraj et al., 2009). E por fim, a terceira classe representada pelo grupo dos compostos cíclicos que apresentam apenas um pirrol (pirrol C) e inclui a cicloprodigiosina C (isolada de *Vibrio gazogenes*, *Alteromonas rubra* e *Pseudoalteromonas denitrificans*) e o butilcicloheptilprodigiosina isolado de *Saccharopolyspora* sp e *Streptomyces coelicolor* (Jeong et al., 2005).

As razões fisiológicas na qual estes micro-organismos sintetizam o pigmento ainda não são bem elucidadas todavia, sabe-se que isolados clínicos altamente resistentes de mesma espécie geralmente, não produzem o pigmento enquanto as cepas ambientais são excelentes produtoras. Logo, sugerindo um mecanismo de defesa para esses micro-organismos (Giri et al., 2004). Estes alcalóides naturais tem sido descritos na literatura por apresentar atividades antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoários, antimalarial, algicida e efeitos inseticidas (Benett e Bentley, 2000; Harri et al., 2004; Williamson et al., 2006; Kim et al., 2007; Elahian et al., 2013). Contudo, a prodigiosina tem despertado um crescente interesse nas diversas áreas

como industrial, biotecnológica, médica e principalmente, farmacêutica por apresentar atividade antitumoral sendo observados efeitos imunossupressores em linfócitos T e B, indução de apoptose, efeitos antitumorais em mielomas, leucemias linfocíticas (T-cell Leukemia), linfomas de Burkitt's e ainda, em câncer de mama, cólon, fígado, pulmão, próstata e outros mais, sendo observados pouco efeitos adversos as células sadias (Montaner e Pérez-Tomas, 2003; Pérez-Tomas et al., 2003; Francisco et al., 2007; Williamson et al., 2007).

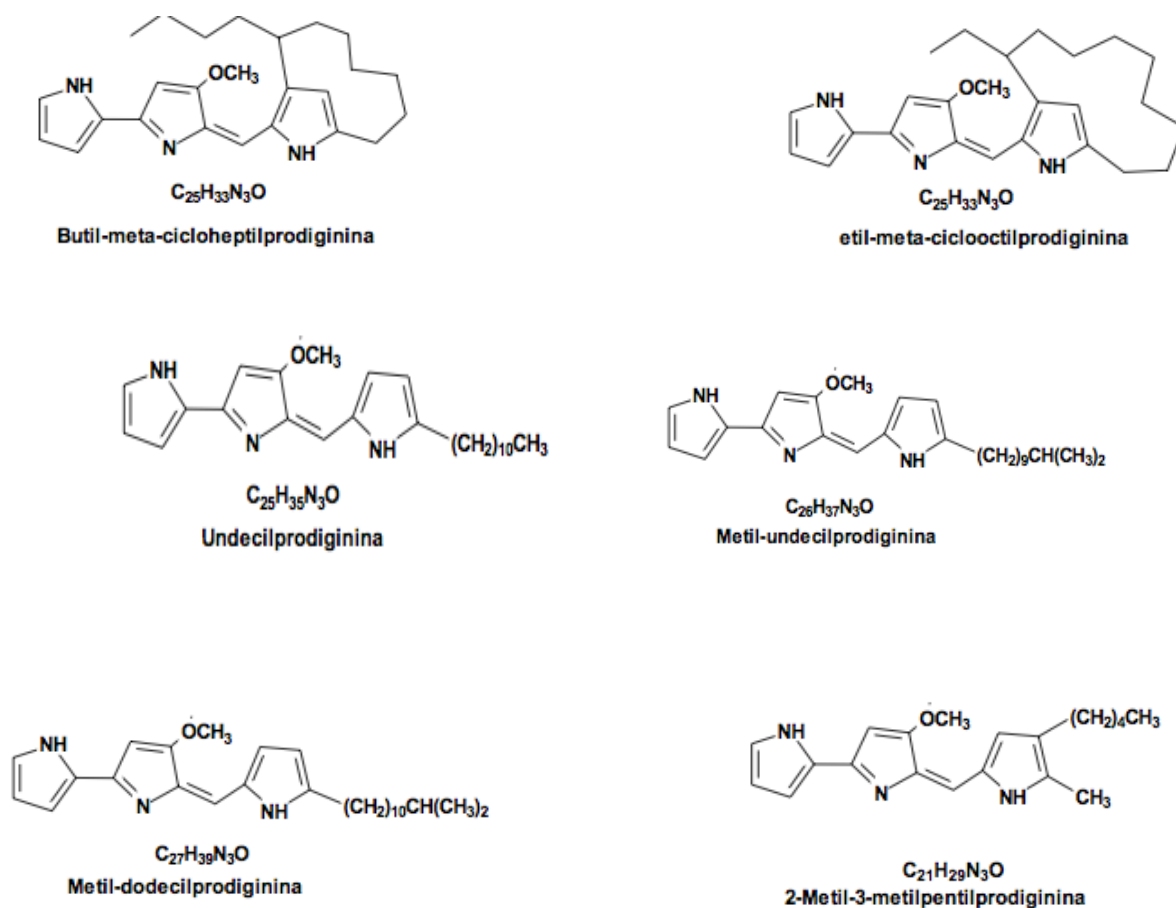


Figura 1. Estruturas químicas dos pigmentos vermelhos pertence a família das prodigininas (Modificado de Valente et al., 2007)

O crescente interesse na formulação de drogas do tipo “prodigiosina” como agente antitumoral e imunossupressor tem sido intensificado nos últimos anos decorrentes de inúmeros fatores. As prodigiosinas de cadeias ramificadas “Alquiprodigiosinas” isoladas de *Streptomyces coelicolor*, apresentam um potencial melhorado na sua atividade imunossupressora e antitumoral (Mo et al., 2005). A undecilprodigiosina, de cadeia ramificada, é a mais bem elucidada na literatura onde estudos demonstram que esta é resultante de várias unidades de acetato, bem como unidades de prolina, glicina e serina (Wasserman et al., 1974). Neste sentido, de acordo com o descrito anteriormente para a atividade citotóxica e antitumoral da prodigiosina, foram avaliados os efeitos citotóxicos do pigmento vermelho isolada de *Serratia marcescens* UFPEDA 398 em linhagens de células tumorais.

Material e Método

Células e condições de cultura

Foram empregadas neste estudo as seguintes linhagens tumorais: NCIH 292 (Carcinoma mucoepidermoide de pulmão), Hep 2 (Carcinoma epidermoide de laringe), MCF 7 (Adenocarcinoma de mama) e HL 60 (Leucemia promielocítica humana). Todas as linhagens foram obtidas do Laboratório de Culturas de Células e Ensaio farmacológicos, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. As linhagens foram cultivadas (2×10^5 células/mL) em frascos ($25 \text{ cm}^2/60 \text{ mL}$) para cultura de tecidos contendo o meio para o cultivo celular, Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (DMEM, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM e incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Isolamento, purificação e caracterização da prodigiosina

A prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* UFPEDA 398 foi obtida a partir dos processos de isolamento, purificação e caracterização previamente descritos pelo protocolo de Nakashima et al., (2005 e 2006), modificado por Lapenda et al., (2014).

Teste de viabilidade celular e atividade citotóxica

A viabilidade celular e a atividade citotóxica da prodigiosina em linhagens de células tumorais foram realizadas pelo teste colorimétrico MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)], após 72 horas de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* desenvolvido por Mosmann et al., (1983) e posteriormente foi adaptado por Alley et al., (2002), para estimar a proliferação e a sobrevivência celular sendo efetivo para evidenciar a citotoxicidade. O teste baseia-se na análise de enzimas celulares que reduzem o corante tetrazólico (MTT) a sua forma insolúvel, o formazan evidenciado pela cor púrpura e que posteriormente é medido pela absorbância em nm. Inicialmente, as células foram cultivadas na concentração de 10^5 células/mL (Bezerra et al., 2008). O controle positivo utilizado foi o quimioterápico padrão doxorrubicina (Dox). As substâncias (teste e controle) foram previamente dissolvidas em DMSO e em seguida, diluídas em série (25 – 0.3 µg/ mL) em meio RPMI 1640 e transferidas para placas de 96 poços (100 µL/poço). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 hora em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e incubadas por mais 3 horas. Após a dissolução do precipitado com DMSO (0,2 µg/mL), foi realizada a leitura das placas em espectrofotômetro de placas a 595 nm e em seguida, mensurados a CL₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) calculados a partir de

regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

Ensaio de citometria com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo PI

A investigação de morte celular por apoptose e necrose foi realizada empregando anexina V-FITC e o iodeto de propídeo PI (Bender MedSystems, Boehringer Maheim) segundo o método descrito por Koopman et al., (1994) e Belossillo et al., (2001). A anexina V liga-se as células que expressam em suas superfícies de membrana a fosfatidilserina, enquanto que o iodeto de propídeo cora o DNA destas células com membrana nuclear comprometida neste ultimo caso, expressando a integridade da membrana celular. Logo, é possível discriminar quantitativamente o número de células viáveis (marcadas com qualquer tipo de fluorocromo), em apoptose inicial (marcadas apenas com a anexina V) e apoptose tardia e necrose (marcados ambas com anexina V e PI). 10^5 células por mL das linhagens NCIH- 292 e Hep-2 foram cultivadas em microplacas de 24 poços contendo 1 mL de meio e incubadas nos tempos de 48 e 72 horas em meio DEMEN, 5% CO₂, a 37 °C na concentração de prodigiosina baseada na IC₅₀ de 3.4 µg/mL. A linhagem HL-60, também analisada, foi incubada nos tempos (48 e 72 horas) a concentração de prodigiosina baseada na IC₅₀ de 1.7 µg/mL em meio RPMI 1640, 5% CO₂, a 37 °C. Como controle positivo e negativos respectivamente foram empregados a Doxorubicina (IC₅₀ 0.2 µg/mL) e apenas o meio de cultura (controle negativo). Após este período, as células foram transferidas para microtubos e lavadas com solução salina (PBS, pH igual a 7.2) a 1480 rpm por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 200 µL de solução tampão de apoptose (Anexin V Binding Buffer- BDPharmingen). O conteúdo de cada tubo foi transferidos para tubos de citometria onde foram adicionados, em seguida, 5 µL de Anexina V-FITC e 10 µL PI. A leitura, no citometro de fluxo (Becton

Dickinson FACS Calibur Flow Cytometer, Mountain View, CA, U.S.A.), foi realizada após 15 minutos, adquirindo-se 20.000 células. A aquisição dos dados foi feita com o software Cell Quest Pro e a análise foi feita utilizando o software Flow Jo 7.6. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0. O teste estatístico utilizado foi ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

Resultados

O pigmento vermelho isolado apresentou absorvância máxima em 534.40 nm e peso molecular de 323 correspondendo a prodigiosina já descrita na literatura. Durante o processo de purificação foi obtida uma segunda fração de pigmentação roxa que apresentou absorvância máxima de 270 nm e peso molecular de 149 conforme já evidenciado no trabalho anterior descrito por Lapenda et al., (2014).

A prodigiosina apresentou efeito citotóxico sendo evidenciado em linhagens de células tumorais estudadas (Tabela 1) a partir da mensuração da dose citotóxica (IC_{50}). As IC_{50} mensuradas para a prodigiosina demonstraram um alto efeito citotóxico do pigmento para todas as linhagens. Segundo Geran et al., (1972) e Alley et al., (1988), substâncias puras com alto efeito citotóxico apresentam IC_{50} igual a 4 $\mu\text{g/mL}$. Para a linhagem MCF 7 foi observada uma IC_{50} acima do descrito por Geran et al., (1972) e Alley et al (1988), sugerindo resistência desta linhagem a prodigiosina. Contudo observamos o efeito citotóxico do pigmento para esta linhagem, quando consideramos o comportamento de resistência da MCF 7. Em comparação, a linhagem HL60 demonstrou ser bastante sensível a prodigiosina, sendo observado uma IC_{50} muito baixa o que potencializa a ação citotóxica da prodigiosina para estas células.

Foi observada indução de apoptose para as linhagens tumorais tratadas com a prodigiosina em 48 e 72 horas. Os resultados obtidos para os tratamentos em 48 horas (Figura

2, 3 e 4) demonstraram indução de apoptose apenas para as linhagem tumoral NCIH 279 com 60 % de apoptose quando comparados com os controles (tabela 2). Nos tratamentos de 72 horas (tabela 3) foram observados resultados altamente significativos para indução de apoptose nas linhagens tumorais avaliadas. Para a linhagem Hep-2 (Figura 5) foi observada uma percentagem de apoptose de 80,5% ($80,55 \pm 10,15$) em relação aos controles negativos Anexina V de 26.3% (26.3 ± 0.8), Iodeto de propídeo PI 0% (0.362 ± 0.035), Anexina V + PI de 19% (19.0 ± 0.7) e para o controle positivo Anexina V + PI de 67% (67.55 ± 4.85). Para a linhagem NCIH 279 a percentagem de apoptose (Figura 6) correspondeu a 42% (42.20 ± 6.11) sendo bastante significativo quando observados os controles (tabela 3). Todavía, para a linhagem HL 60 esta percentagem foi muito baixa 5% (5.26 ± 2.88) não sendo considerado efeito apoptótico para estas células.

Tabela 1. Mensuração da IC₅₀ para a citotoxicidade da prodigiosina frente as linhagens de células tumorais.

Linhagem celular	Drogas IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		
	Prodigiosina	Fração roxa	Doxorrubicina
NCHI-292	3,6	11,6	0,2
Hep-2	3,4	15,2	0,7
MCF-7	5,1	15,6	0,2
HL 60	1,7	11,7	0,2

Tabela 2. Percentual de indução de apoptose em linhagens tumorais expostas a prodigiosina (IC₅₀ 3.4 µg/mL) após 48 horas.

AMOSTRAS	TEMPO	MÉDIA + DP (%)			
		*ANEX (%)	**PI (%)	***A+PI (%)	****CV(%)
Hep-2 . Controle -	48 h	0.2135 ± 0.009	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	99.75 ± 0.05
Hep-2. Controle - Anex	48 h	9.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	90.7 ± 0.35
Hep-2. Controle - PI	48 h	0.186 ± 0.0	0.0655±0.0105	0.0 ± 0.0	99.75 ± 0.05
Hep-2. Controle - A +PI	48 h	7.57 ± 0.93	0.0 ± 0.0	0.0245 ± 0.008	92.4 ± 0.9
Hep-2.Controle +	48 h	7.57 ± 0.93	0.0 ± 0.0	0.0245 ± 0.008	92.4 ± 0.9
Hep-2.Prodigiosina	48 h	5.71 ± 1.01	0.0 ± 0.0	0.019 ± 0.014	94.25 ± 1.05
HL 60. Controle -	48 h	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
HL 60. Controle – Anex	48 h	3.495 ± 0.586	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	96.25 ±0.212
HL 60. Controle – PI	48 h	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
HL 60. Controle - A+ PI	48 h	2.7 ± 0.02	0.0 ± 0.0	0.014 ± 0.024	97.2 ± 0.57
HL 60. Controle +	48 h	4.99 ± 2.66	0.0 ± 0.0	0.0336 ± 0.0334	94.91 ± 2.78
HL 60. Prodigiosina	48 h	3.55 ± 0.43	0.0008 ± 0.0020	0.0298 ± 0.0174	96.33 ± 0.40
NCIH 279. Controle -	48 h	0.496 ± 0.230	0.0 ± 0.0	0.0061 ± 0.0063	98.58 ± 2.001
NCIH 279. Controle – Anex	48 h	17.55 ± 0.49	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	82.45 ± 0.49
NCIH 279 Controle – PI	48 h	0.581 ± 0.042	0.364 ± 0.004	0.0 ± 0.0	99.05 ± 0.070
NCIH 279. Controle - A+ PI	48 h	27.97 ± 0.974	0.0 ± 0.0	0.0842 ± 0.0389	71.95 ± 0.91
NCIH 279. Controle +	48 h	53.06 ± 7.02	0.0 ± 0.0	2.073 ± 1.452	44.87 ± 8.31
NCIH 279. Prodigiosina	48 h	60.56 ± 0.81	0.0 ± 0.0	3.25 ± 1.22	36.03 ± 1.30

*Anex (Anexina V-FITC); **PI (Iodeto de propídeo); *** Anex +PI (Anexina mais PI) e **** CV (Células viáveis)

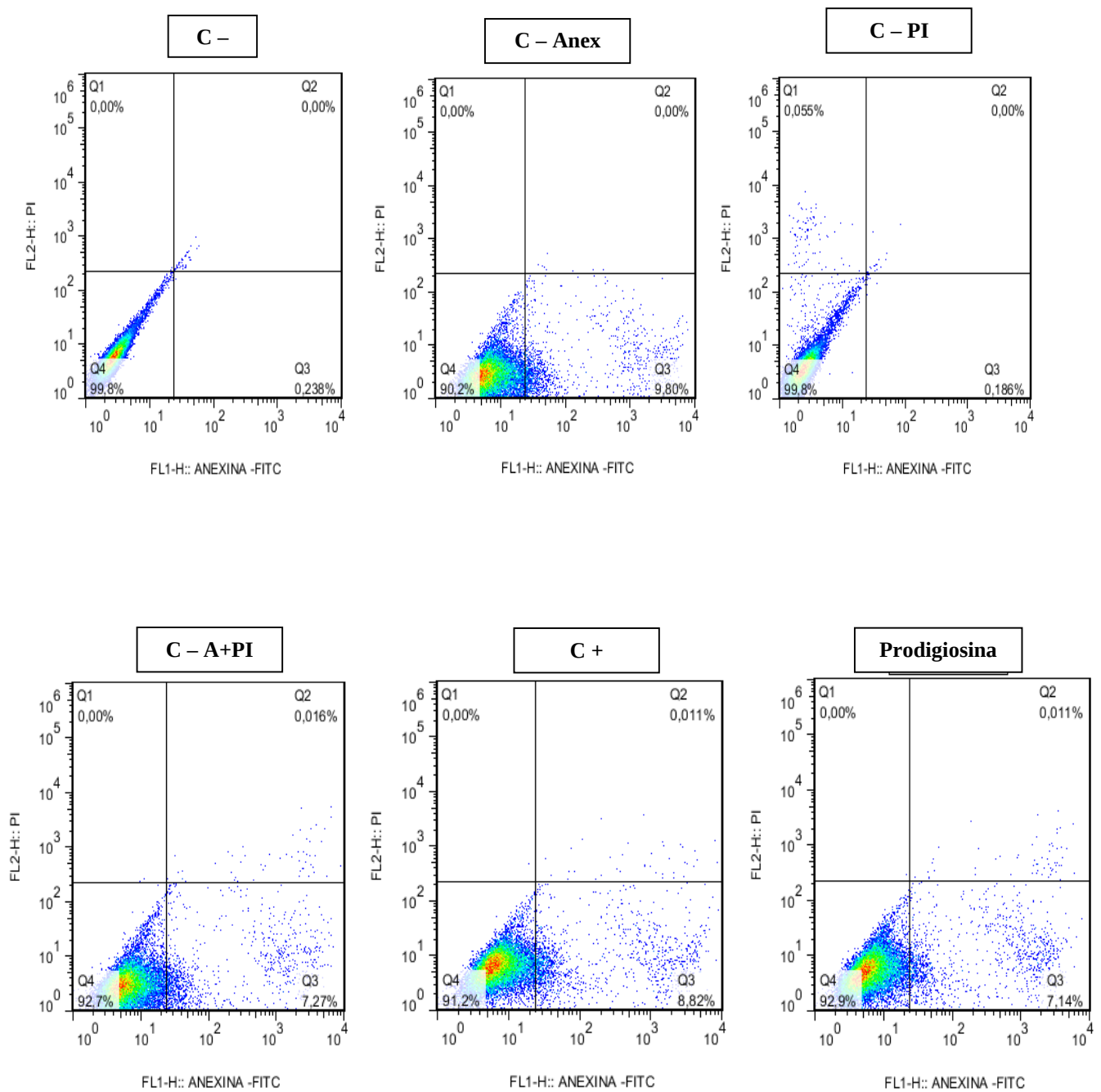


Figura 2. Percentual de indução de apoptose e necrose para a linhagem Hep 2 após exposição de 48 horas a prodigiosina (IC₅₀ 3,4 µg/ mL). (C- controle negativo; C+ controle positivo doxorrubicina; C-Anexina Controle negativo anexina; C-PI controle negativo iodeto de propídeo; C-A+P Controle negativo anexina mais iodeto de propídeo).

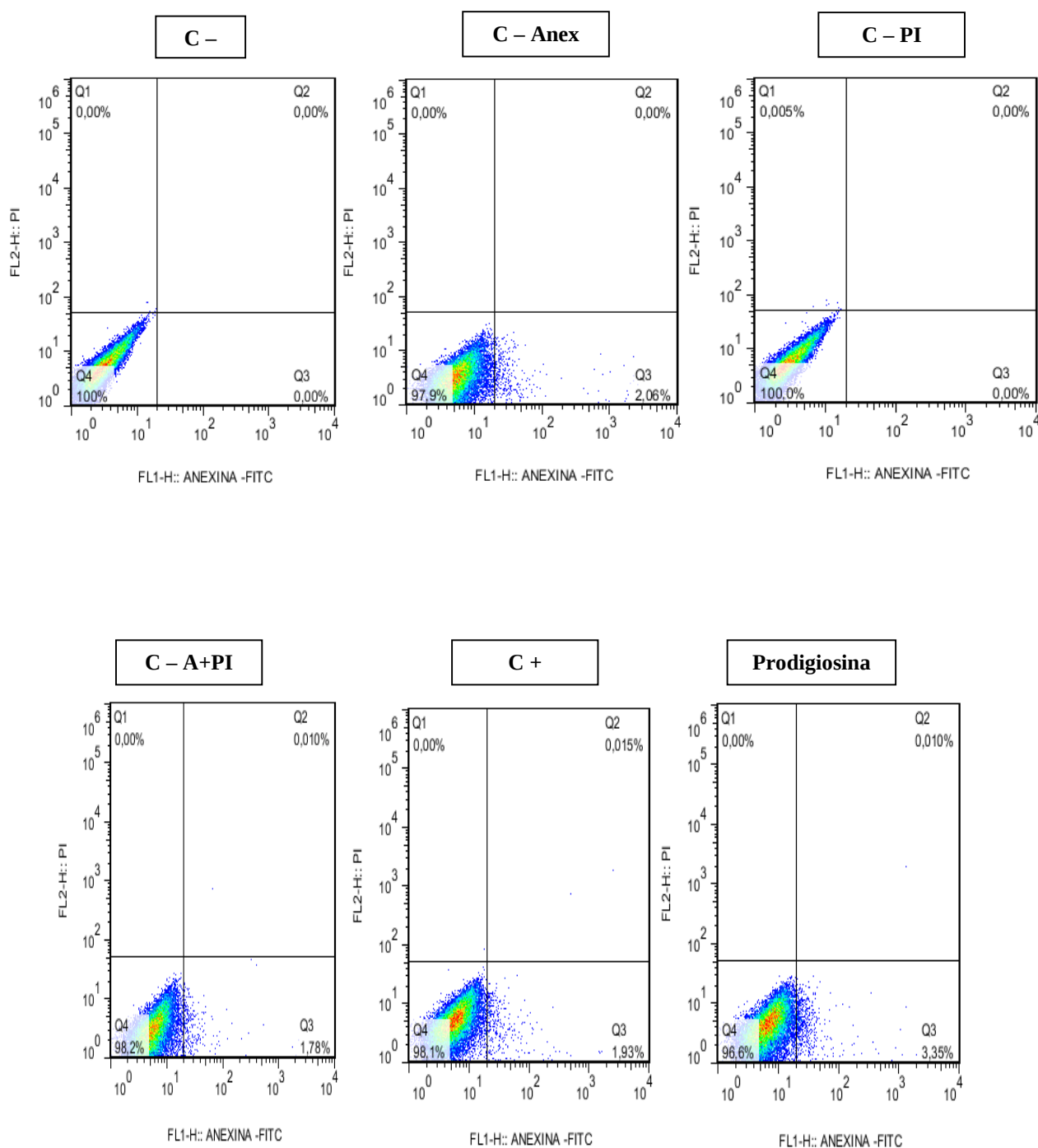


Figura 3. Percentual de indução de apoptose e necrose para a linhagem HL 60 após exposição de 48 horas a prodigiosina ($IC_{50} = 3,4 \mu\text{g/ mL}$). (C- controle negativo; C+ controle positivo doxorrubicina; C-Anexina Controle negativo anexina; C-PI controle negativo iodeto de propídeo; C-A+P Controle negativo anexina mais iodeto de propídeo).

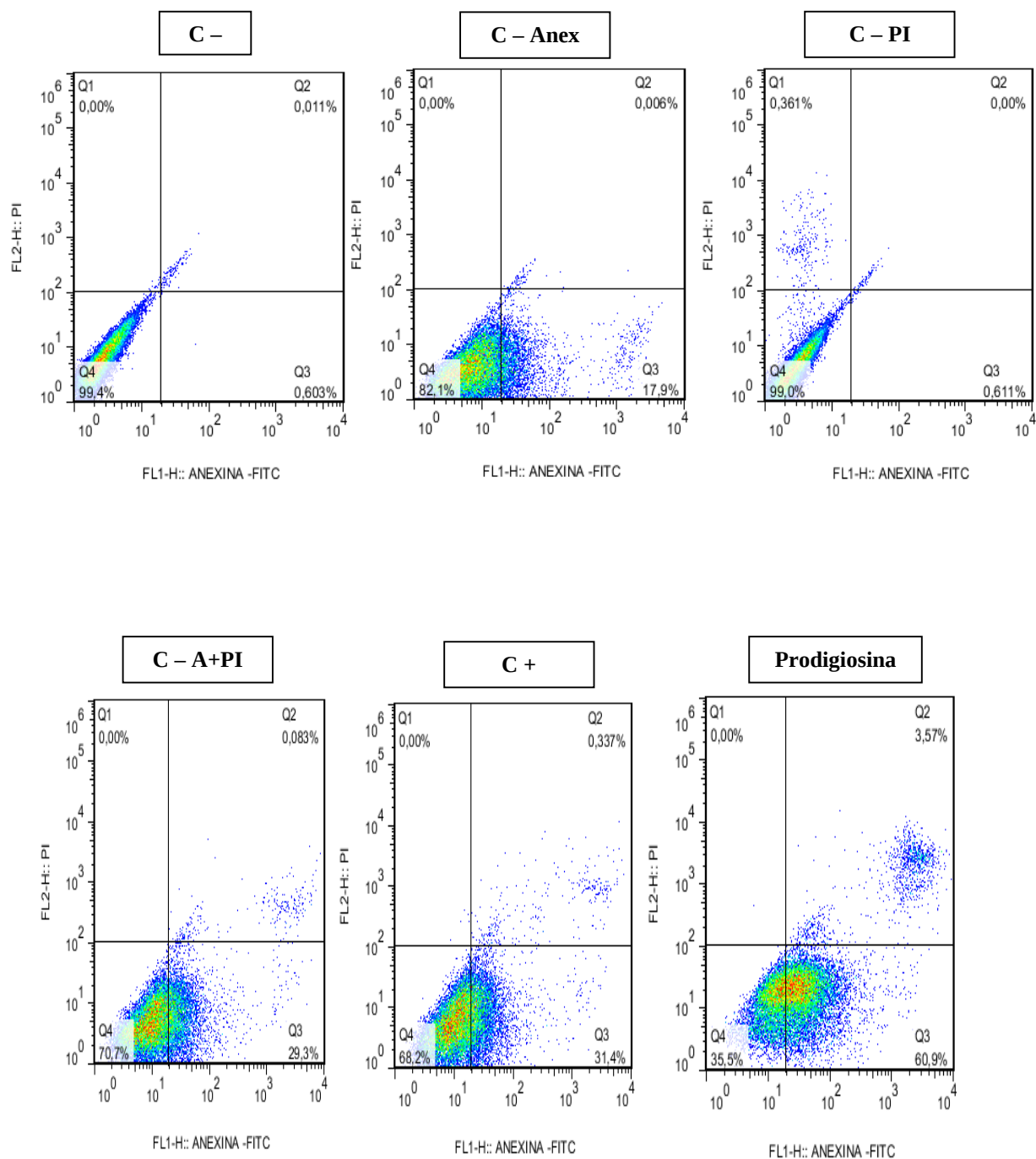


Figura 4. Percentual de indução de apoptose e necrose para a linhagem NCIH 279 após exposição de 48 horas a prodigiosina ($IC_{50} = 3,4 \mu g/mL$). (C- controle negativo; C+ controle positivo doxorrubicina; C-Anexina Controle negativo anexina; C-PI controle negativo iodeto de propídeo; C-A+P Controle negativo anexina mais iodeto de propídeo).

Tabela 3. Percentual de indução de apoptose em linhagens tumorais expostas a prodigiosina (IC₅₀ 3.4 µg/mL) após 72 horas.

AMOSTRAS	TEMPO	MÉDIA (%) + DP (%)			
		*ANEX(%)	**PI(%)	***A+PI(%)	****CV(%)
Hep-2 . Controle -	72 h	0.2445 ± 0.0005	0 ± 0	0 ± 0	99.8 ± 0.0
Hep-2. Controle - Anex	72 h	26.3 ± 0.8	0 ± 0	0.003 ± 0.003	73.7 ± 0.8
Hep-2. Controle - PI	72 h	0.362 ± 0.035	0.4325 ± 0.0165	0.0125 ± 0.0065	99.2 ± 0.0
Hep-2. Controle - A +PI	72 h	19.0 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.162 ± 0.015	80.85 ± 0.75
Hep-2. Controle +	72 h	67.55 ± 4.85	0.0035 ± 0.0035	0.0224 ± 0.073	32.15 ± 4.95
Hep-2. Prodigiosina	72 h	80.55 ± 10.15	0.0 ± 0.0	0.3895 ± 0.0805	19.02 ± 10.07
HL 60. Controle -	72 h	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
HL 60. Controle – Anex	72 h	3.85 ± 0.07	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	96.2 ± 0.14
HL 60. Controle – PI	72 h	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
HL 60. Controle - A+ PI	72 h	2.03 ± 1.35	0.0 ± 0.0	0.011 ± 0.020	97.27 ± 0.05
HL 60. Controle +	72 h	3.64 ± 0.45	0.0 ± 0.0	0.0315 ± 0.0162	96.4 ± 0.44
HL 60. Prodigiosina	72 h	5.26 ± 2.88	0.0 ± 0.0	0.0562 ± 0.0472	94.68 ± 2.92
NCIH 279. Controle -	72 h	0.2513 ± 0.0314	0.0 ± 0.0	0.0008 ± 0.0020	99.73 ± 0.051
NCIH 279. Controle – Anex	72 h	44.15 ± 0.63	0.0 ± 0.0	0.005 ± 0.007	55.85 ± 0.63
NCIH 279 Controle - PI	72 h	0.1825 ± 0.054	8.045 ± 0.049	0.0565 ± 0.0219	91.7 ± 0.0
NCIH 279. Controle - A+ PI	72 h	24.85 ± 1.20	0.127 ± 0.004	9.85 ± 0.1202	65.15 ± 1.06
NCIH 279. Controle +	72 h	39.14 ± 2.06	2.36 ± 5.16	8.8 ± 4.38	51.2 ± 1.73
NCIH 279. Prodigiosina	72 h	42.20 ± 6.11	0.0605 ± 0.0306	25.50 ± 14.27	35.50 ± 13.88

*Anex (Anexina V-FITC); **PI (Iodeto de propídeo); *** Anex +PI (Anexina mais PI) e **** CV (Células viáveis)

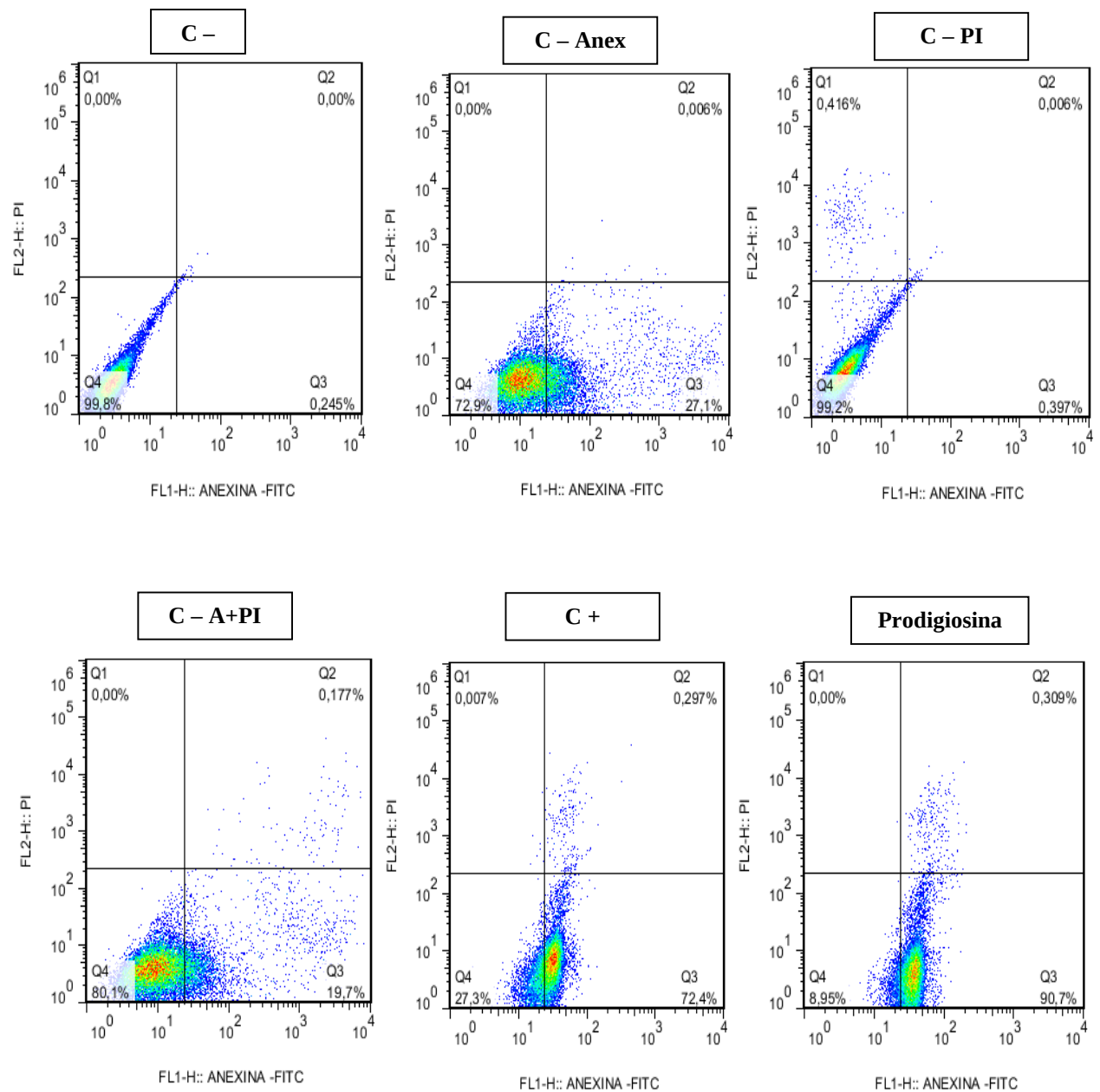


Figura 5. Percentual de indução de apoptose e necrose evidenciados para a linhagem Hep-2 após exposição de 72 horas a prodigiosina ($IC_{50\%} = 3,4 \mu\text{g/ mL}$). (C- controle negativo; C+ controle positivo doxorrubicina; C-Anexina Controle negativo anexina; C-PI controle negativo iodeto de propídeo; C-A+P Controle negativo anexina mais iodeto de propídeo).

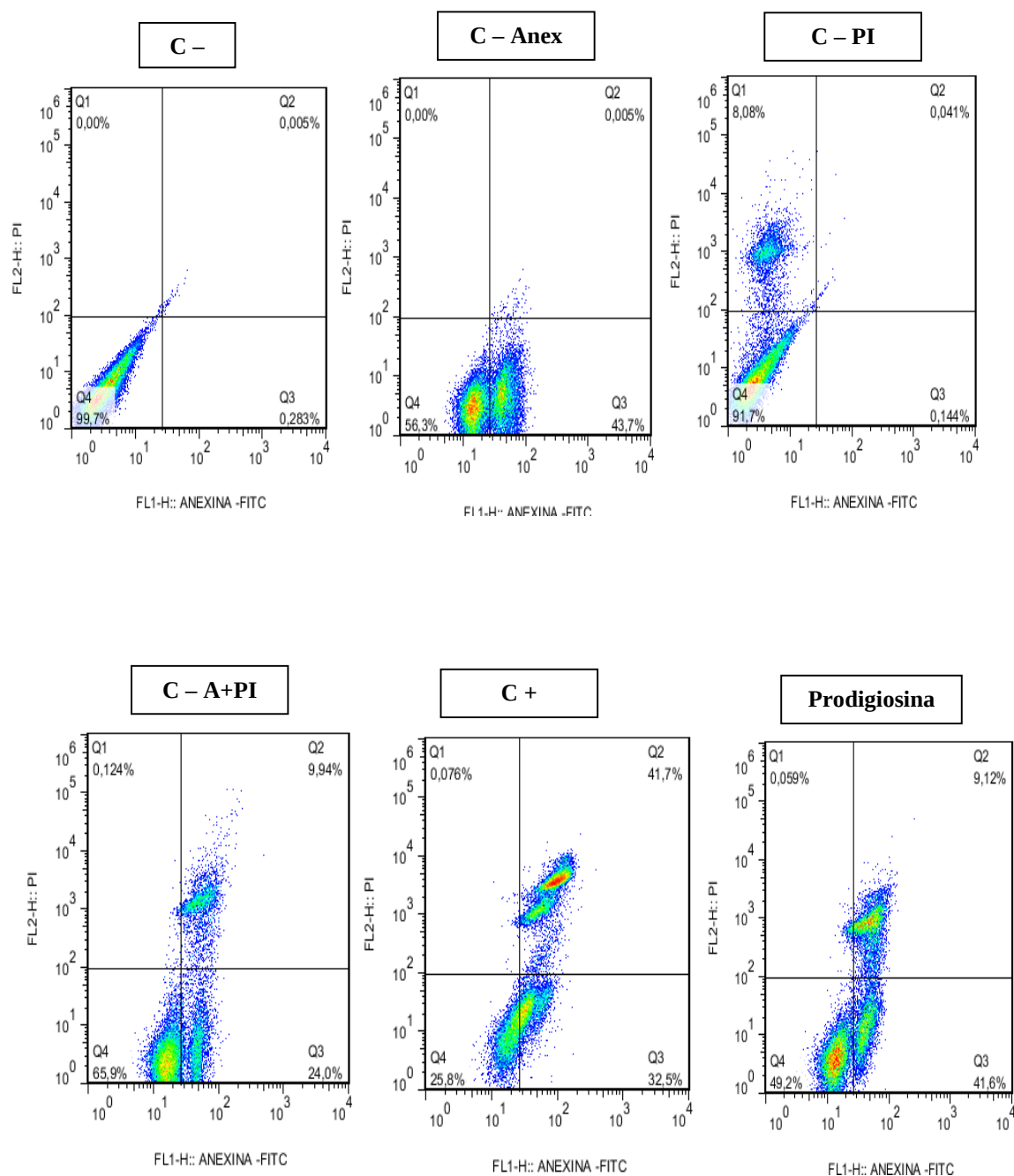


Figura 6. Percentual de indução de apoptose e necrose para a linhagem NCIH 279 após exposição de 72 horas a prodigiosina ($IC_{50} = 3,4 \mu g/mL$). (C- controle negativo; C+ controle positivo doxorrubicina; C-Anexina Controle negativo anexina; C-PI controle negativo iodeto de propídeo; C-A+P Controle negativo anexina mais iodeto de propídeo).

Discussões

Sabe-se que a prodigiosina quando em meio ácido e neutro apresenta coloração avermelhada com espectro de absorção máximo entre 535–540 nm. Em meio alcalino o pigmento apresenta coloração laranja-amarelado e um espectro de absorção com pico máximo em 470 nm (Feofilova et al., 1974).

Após a etapa de purificação do pigmento pelo método em coluna cromatográfica (TLC) foram observados a separação de duas frações que chamaram a atenção por apresentarem pigmentações diferenciadas. A primeira, de coloração rosa-avermelhada e a segunda roxa.

Segundo Williamson e colaboradores., (2007), o pigmento de coloração vermelha é o alcalóide tipirrol, prodigiosina (4-methoxi-5-[(Z)-(5-methyl-4-pentil-2*H*-pirrol-2-ildina)methyl]-1*H*,1'*H*-2,2'-bipirrol) cuja formula estrutural e peso molecular são respectivamente $C_{20}H_{25}N_3O$ e 323 g/mol.

Em estudos, Guryanov e colaboradores., (2013), após a caracterização do pigmento por espectrofotometro infra vermelho NMR, descreve a fração vermelha isolada de *Serratia marcescens* ATCC9986 como sendo a prodigiosina cujo peso moleclar achado correspondeu a 322,9 m/z. Em nossos dados foi observada uma segunda fração roxa. Esta fração, cujas propriedades biológicas ainda não foram descritas, apresentou peso molecular correspondente a 149 m/z. Entretanto Guryanov et al., (2013), sugere que seja um dos precursores da prodigiosina o monopirrol (Monopirrol -MAP) formado a partir de uma rota biossintética paralela que se convergem com uma segunda rota de formação de um segundo precursor, o bipirrol (Bipirrol – BMC) resultando no pigmento vermelho denominado prodigiosina. Em corroboração Isaka et al., (2002) e Jeong et al., (2005), afirmam que a fração roxa corresponde ao monopirrol (MAP) precursor da prodigiosina.

Da Silva et al., (2009) descreve o pigmento vermelho obtido a partir de meios empregando o glicerol como fonte de carbono como sendo a prodigiosina de peso molecular igual 323 m/z. Em adicional, Asano et al., (1999) e Parani et al., (2008) corroboram com os dados descritos por Da Silva e colaboradores., (2009) quanto a caracterização da prodigiosina.

Neste estudo foi avaliada a atividade citotóxica da prodigiosina produzida por *S. marcescens* UFPEDA 398 em linhagens de células isoladas de tumores sólidos e leucemia (HL60). Os resultados da exposição celular *in vitro* após 72 horas, demonstraram que a prodigiosina induziu efeito citotóxico nas linhagem de células tumorais estudadas e que estes resultados se mostraram bastante significativos (tabela 1) quando comparados com o quimioterápico padrão doxorrubicina. A linhagem HL60 apresentou-se mais susceptível a ação da prodigiosina quando comparada com a MCF-7, que apresentou leve resistência.

Em estudos, Elahian et al., (2013), demonstram o efeito citotóxico da prodigiosina nas linhagens tumorais A2780 (câncer epitelial de ovário) e EPG85-257 (carcinoma gástrico) onde foram encontrados IC₅₀ de 8.92 µg/mL e 8.45 µg/mL respectivamente quando comparados com a doxorrubicina (IC₅₀ 0.07 µg/mL). Estes dados corroboram com os obtidos em nosso trabalho onde foram achados valores para a IC₅₀ inferiores a 3.6 µg/mL. Foi observado que a linhagem tumoral MCF-7 quanto tratada com prodigiosina (IC₅₀ 5.5 µg/mL) apresentou-se menos sensível ao pigmento. Todavía, Ho e colaboradores., (2009), descreve ação citotóxica para a prodigiosina frente a linhagem MCF-7 (IC₅₀ 3.5 µg/mL) e significativa ação citotóxica para a linhagem MCF-10 quando observadas IC₅₀ superiores a 10 (IC₅₀ > 10).

Em estudos antitumorais Williamson e colaboradores., (2007) corrobora com os achados nesta pesquisa descrevendo os efeitos citotóxicos e antitumorais da prodigiosina assim como Manderville e colaboradores., (2001), Liu e colaboradores., (2005) que descreve os efeitos citotóxicos e antitumorais da metacicloprodigiosina e Pérez-Tómas e colaboradores.,

(2003) descrevendo os efeitos apoptóticos em corroboração com Melvin e colaboradores., (2002).

Foi avaliado também o efeito citotóxico da fração roxa. O pigmento roxo apresentou baixo efeito citotóxico nas linhagens tumorais estudadas evidenciados pela mensuração da IC₅₀ cujo menor resultado foi de 11,6 µg/ mL para NCIH-292 e a maior IC₅₀ de 15.6 µg/mL para a linhagem MCF-7). O baixo efeito citotóxico da fração roxa foi baseado nos descrito por Alley et al., (1988) que estabelece um padrão de citotóxicidade para substâncias puras (igual ou menor que IC₅₀ 3.4 µg/mL). Desta forma foi observado que a fração roxa não apresentou efeitos citotóxicos significativos para as linhagens tumorais estudadas quando comparado com a doxorrubicina e a prodigiosina.

Foram avaliados os efeitos apoptóticos da prodigiosina. O pigmento prodigiosina induziu apoptose inicial e tardia (necrose) em linhagens tumorais expostas a 72 horas na concentração de 3.4 µg /mL.

Nos últimos anos, o mecanismo de morte celular natural e programada denominado de apoptose tem sido diferenciado pelas suas características morfológicas da necrose. Sabe-se que a indução da apoptose na célula é regulada por uma ação gênica que envolve a expressão da proteína regulatória denominada de p53. Esta regulação da apoptose envolve duas classes de proteínas as pró-apoptóticas (Família das Caspases; Bcl-2 ; Bid que promovem a liberação de citocromos C das mitocôndrias para o citoplasma) e as anti-apoptóticas (IAPs) que inibem as caspases e consequentemente, a não indução da apoptose. (Pandey et al., 2009; Chang et al., 2011). Os mecanismos apoptóticos tem sido bastante estudados considerando que estes representam uma forma de supressão dos diferentes estágios tumorais (Lu et al., 2012).

A prodigiosina é conhecida, principalmente, pela sua atividade apoptótica em linhagens de células tumorais. Este efeito apoptótico da prodigiosina sugere a sua ação seletiva

para as células malignas independem da ação da *p53* e resistência celular à droga antitumorais sugerindo assim como sendo um potente atitumoral (Hsieh et al., 2012).

Em estudos Lorenzo et al., (2009), afirma que quebras cromossômicas que levam a danos irreversíveis no DNA induzem a célula a ativação do mecanismo apoptótico. Em nossos estudos foram observados que as linhagens celulares expostas a prodigiosina em 48 horas não apresentaram efeito apoptótico significativo, exceto para a linhagem NCHI 279 (60 % de apoptose inicial). A ausência de apoptose as demais linhagens expostas em 48 horas não elimina a hipótese de evidências de danificação genômicas. Contudo, após 72 horas foram observados resultados significativos para a apoptose, o que sugere que neste tempo de 72 horas, uma vez expostas a prodigiosina, estas células possam ter sofrido danos irreversíveis ao DNA o que induziu a ativação do mecanismo apoptótico.

Segundo Montaner et al., (2003), *in vitro* a prodigiosina promove quebras no DNA facilitando a oxidação da dupla fita, o que sugere uma correlação direta com a atividade citotóxica. Essas quebras ao DNA celular induzem acumulação da proteína *p53*, supressora de tumor. Contudo, foi observada que a ação citotóxica da prodigiosina ocorre independentemente da *p53* em linfócitos B, HL 60 e nas linhagens Junkart.

Guryanov et al., (2013), afirma que a prodigiosina produz um forte efeito citotóxico mesmo na menor concentração de 1.0 µg/mL. Desta forma, sugerindo assim futuros estudos deste pigmento para mensurar possíveis níveis de danificação genômica em linhagens tumorais e normais a fim de elucidar melhor o mecanismo alvo-específico da prodigiosina.

Diante dos dados encontrados neste trabalho demonstramos que a prodigiosina apresenta atividade citotóxica em linhagens de células tumorais induzindo apoptose e necrose e sugerindo estudos futuros de genotoxicidade para avaliação da atividade genotóxica. Neste sentido, em

estudos posteriores foram mensurados os efeitos genotóxicos da prodigiosina produzido por *S. marcescens* UFPEDA 398.

Conclusões

Neste estudo o pigmento vermelho isolado de *Serratia marcescens* UFPEDA 398 corresponde a prodigiosina previamente descrita na literatura. A fração roxa obtida não apresentou significativa atividade citotóxica. Contudo o mesmo não foi observado para a prodigiosina, que apresentou significativo efeito citotóxico induzindo apoptose em linhagens de células isoladas de tumorais, sugerindo ao promissora atividade antitumoral. Contudo, apesar da potente atividade citotóxica da prodigiosina são necessários a realização de estudos genotóxicos que elucidem melhor tais mecanismos de ação e sua ação alvo-específica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe técnica responsável, a Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio físico e estrutural, cedendo seus laboratórios para realização dos ensaios e aos órgãos de fomento de fundamental importância como CNPq e CAPES.

Referências Bibliográficas

- Alley, E., Green, R., Schuchter, L. (2002). Cutaneous toxicities of cancer therapy. *Current opinion in Oncology*, 14 (2), 212-216.
- Asano, S. et al. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* enhances the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin (Cry1C) against common cutworm, *Spodoptera litura*. *Nippon Noyaku Gakkaishi*. 1999. v. 24, n. 4, p. 381-385.

Bennett JW, Bentley R. "Seeing red: The story of prodigiosin". *Adv Appl Microbiol.* 2000. 47: 1–32.

Bellosillo, B., Villamor, N., López-Guillermo, A., Marcé, S., Esteve, J., Campo, E., & Montserrat, E. (2001). Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood*, 98 (9), 2771-2777.

Bezerra, R. J. S. (2008). *Avaliação da modulação das atividades da óxido nítrico sintase (NOS)/arginase como participantes do sistema de defesa de Leishmania amazonensis frente a derivados de compostos mesoiônicos* (Doctoral dissertation, Instituto Oswaldo Cruz).

Cerdeno, A. M.; Bibb, M. J.; Charlis, G. L. "Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coecoler* A3 (2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes". *Chemistry & Biology*. 2001. 8: 817-829.

Chang, C. C., Wang, Y. H., Chern, C. M., Liou, K. T., Hou, Y. C., Peng, Y. T., Shen, Y. C. (2011). Prodigiosin inhibits gp91 and iNOS expression to protect mice against the oxidative/nitrosative brain injury induced by hypoxia–ischemia. *Toxicology and applied pharmacology*, 257(1), 137-147.

Davaraj N, Dharumaduari D, Noorudin T, Annamalai P. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and its Cytotoxicity activity. *J. Pharmacy Res.* 2009. 590-593.

Da Silva, Gervásio Paulo; Mack, Matthias; Contineiro, Jonas. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances*. 2009, v. 27, n. 1, p. 30-39.

Elahian F, Moghimi B, Dinmohammadi F, Ghamghami M, Hamidi M, Mirzaei SA. The anticancer gene Prodigiosin is not a multidrug resistance protein substrate. *DNA and Cell Biology*. 2013. 32(3): 90-97.

Feofilova, E. P. (1974). *Pigments of Microorganisms*.

Francisco R, Pérez-Tomás R, Giménez-Bonafé P, Soto-Cerrato V, Giménez-Xavier P, Ambrosio S. 1. Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Pharmacol*. 2007. 31;572(2-3).

Giri A, Anandkumar G, Muthukumaran G, Pennathur. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*. 2004. 4,11.

Guryanov DI, Karamova NS, Yusupova DV, Gnezdilov OI, Koshkarova AL. Bacterial pigment prodigiosin and its genotoxic effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2013. 39 (1): 106-111.

Harris AKP, Williamson, NR, Slater H, Cox A, Abbasi S, Fouds I, Simonsen H, Leeper Fj, Salmond GPC. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology*. 2004. 150 (11): 3547-3560.

Ho, T. F., Ma, C. J., Lu, C. H., Tsai, Y. T., Wei, Y. H., Chang, J. S., Chang, C. C. (2007). Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicology and applied pharmacology*, 225(3), 318-328.

Ho TF, Peng, YT, Chuang SM, Lin SC, Feng BL, Lu CH, Yu WJ, Chang JS, Chang CC. Prodigiosin down-regulates survivin to facilitate paclitaxel sensitization in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235: 253- 26, 2009.

Hsieh, H. Y., Shieh, J. J., Chen, C. J., Pan, M. Y., Yang, S. Y., Lin, S. C., ... & Chang, C. C. (2012). Prodigiosin down-regulates SKP2 to induce p27KIP1 stabilization and antiproliferation in human lung adenocarcinoma cells. *British journal of pharmacology*, 166(7), 2095-2108.

Jeong H, Yim H, Lee C, Choi H, Park Y, Yoon S, Hur G, Kang H, Kim D, Lee H, Park K, Park S, Lee K, Kim J. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic Acids Res.* 2005. 33, 7066-73.

Kim D, Lee JS, Park YK, Kim JF, Jeong H, Oh TK, Kim BS, Lee CH. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. 102: 937–944.

Kim, D., Kim, J. F., Yim, J. H., Kwon, S. K., Lee, C. H., Lee, H. K. (2008). Red to red-the marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(10), 1621-1629.

Koopman, G., et al. "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." *Blood* 84.5 (1994): 1415-1420.

Lapenda, J.L., Maciel, C. C. S., Xavier, H. S., da Silva, C. A., Campos-Takaki, G. M. (2014). Production and toxicological evaluation of Prodigiosin from *Serratia marcescens* UCP/WFCC1549 on Mannitol Solid Medium. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 7(2), 32-38.

Liu, Rui et al. Potent in Vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. *Archives of pharmacological research*. 2005. v. 28, n. 12, p. 1341-1344.

Lorenzo, Y., Azqueta, A., Luna, L., Bonilla, F., Domínguez, G., & Collins, A. R. (2009). The carotenoid β -cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis*, 30(2), 308-314.

Lorenzo, Y., Costa, S., Collins, A. R., Azqueta, A. (2013). The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, 0- 18.

Lu, C. H., Lin, S. C., Yang, S. Y., Pan, M. Y., Lin, Y. W., Hsu, C. Y., ... & Chang, C. C. (2012). Prodigiosin-induced cytotoxicity involves RAD51 down-regulation through the JNK and p38 MAPK pathways in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology letters*, 212(1), 83-89.

Manderville, R. A. Synthesis, proton-affinity and anti-cancer properties of the prodigiosin-group natural products. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2001. v. 1, n. 2, p. 195-218.

Melvin, Matt S. et al. Influence of the A-ring on the proton affinity and anticancer properties of the prodigiosins. *Chemical research in toxicology*. 2002. v. 15, n. 5, p. 734-741.

Mo, S. J.; Kim, B. S.; Reynolds, K. A., "Production of Branched-Chain Alkylprodiginines in *Streptomyces coelicolor* by Replacement of the 3-Ketoacyl ACP Synthase III Initiation Enzyme, RedP". *Chemistry & Biology*. 2005 12 (2): 191-200.

Montaner, B, Pérez-Tomáz R. The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets*. 2003.3(1):57-65.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods*. 1983. 65: 55-63.

Nakashima T, Kurachi M, Kato Y, Yamaguchi K, Oda T. Characterization of bacterium isolated from the sedimenta t Coastal área of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolated. *Microbiol. Immunol.* 2005. 49, 407-415.

Nakashima T, Myiazaki Y, Matsuyam Y, Muraoka W, Yamaguchi K, Oda T. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γ-proteobacterium*. *App. Microbiol. Biotechnol.* 73, 684–690, 2006.

Parani, K. et al. Optimization of prodigiosin production from a strain of *Serratia marcescens* SR1 and screening for antifungal activity. *Journal of Biological Control*. 2008. v. 22, n. 1, p. 73-79.

Pandey, R., Chander, R., Sainis, K. B. (2009). Prodigiosins as anti cancer agents: Living upto their name. *Current pharmaceutical design*, 15(7), 732-741.

Pérez-Tomáz, Ricardo et al. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochemical pharmacology*. 2003. v. 66, n. 8, p. 1447-1452.

Silva Júnior, E. N. D., de Moura, M. A. B., Pinto, A. V., Pinto, M. D. C. F., de Souza, M. C. B., Araújo, A. J., Goulart, M. O. (2009). Cytotoxic, trypanocidal activities and physicochemical parameters of nor-²-lapachone-based 1, 2, 3-triazoles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(4), 635-643.

Singh, Narendra P., et al. "DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes." *Mutation Research/DNAging* 237.3 (1990): 123-130.

Tice, R. R., et al. "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." *Environmental and molecular mutagenesis* 35.3 (2000): 206-221.

Vendruscolor F, Fernanda K, Luana de OP, Jorge LN. Production of single cell protein from apple pomace using state solid fermentation. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. 01, 53-57, 2007.

Wasserman, H.H., Shaw, C. K.; Sykes, R. J. "The biosynthesis of metacycloprodigiosin and undecyl prodigiosin". *Tetrahedron Letters*. 1974. 33, 2787–2790.

Williamson PC, Fineran FJ, Leeper G, Salmond PC, Neil R. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginine. *Nature Reviews Microbiology*. 2006.4:887-899.

Williamnson NR, Fineran PC, Gristwood T, Chawrai SR, Leeper FJ, Salmond GP. "Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines". *Future Microbiol.* 2007.2 (6): 605–618.

Capítulo 3

Evidência de danificação genômica induzida por prodigiosina em células humanas mononucleadas normais

Lapenda, J.C.L.¹, Adam, M.L.², Nascimento, S.C.³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória-UFPE CAV.

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.

Artigo submetido a Revista Cytothecnology

***Autor para correspondência:**

¹Jeanne Cristina Lapenda Lins, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife-PE, Brasil. Fone.: 81-2126 8346; Ramal: 207 ou (81) 8859 4299.
E-mail: jeannecantalice@gmail.com

Evidência de danificação genômica induzida por prodigiosina em células humanas mononucleadas normais

Lapenda, J.C.L.¹, Adam, M.L.², Nascimento, S.C.³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória-UFPE CAV.

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.

Resumo

A prodigiosina, 2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno, é um pigmento vermelho natural pertencente à classe das prodigininas. Este pigmento vermelho, destaca-se por apresentar atividades biológicas antimicrobianas, antimalarial e antitumoral, despertando o interesse das diversas áreas médica, farmacêutica e industrial, pela sua utilização. Neste sentido, o presente estudo objetivou evidenciar possíveis danificações genômicas induzidas pela prodigiosina em células humanas mononucleadas normais. A prodigiosina extraída de *S. marcescens* foi purificada por cromatografia em coluna, identificada por espectrometria Uv-vis e caracterizada por espectrofotometria de massa GCMS, tendo ao final obtido o peso molecular de 323,4. As amostras celulares foram obtidas a partir da coleta de sangue periférico humano, sendo cultivadas em meio RPMI 1640 com fitohemaglutinina, por 48 horas. Após este período, as mesmas foram expostas a diferentes concentrações de prodigiosina (0,5 ; 1,0 ; 10,0 e 100,0 μM / mL) e incubadas por mais 24 horas. Em seguida, foram realizados os testes de genotoxicidade (Teste de Micronúcleo MN e Ensaio Cometa). Neste estudo foram observadas células micronucleadas após a exposição às diferentes concentrações de prodigiosina. Foi observado um efeito genotóxico estatisticamente significativo em todos os tratamentos. Células apoptóticas também foram visualizadas nas maiores concentrações de prodigiosina. Os resultados do teste de Kruskal Wallis para a frequência de células micronucleadas apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre todas as concentrações de prodigiosina, em relação ao controle negativo. Com relação ao controle positivo, não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências de células micronucleadas nas diferentes concentrações de prodigiosina, exceto na concentração de 0,5 μM / mL para ambas as substâncias (prodigiosina e doxorubicina). Estes resultados foram comprovados pelo teste de Turkey. A análise dos índices de danos obtidos no Ensaio Cometa demonstrou diferenças significativas em relação ao controle negativo para as concentrações 1,0, 10,0 e 100,0 μM de prodigiosina. Não foram encontradas diferenças significativas, tanto em relação às frequências de células micronucleadas quanto aos índices de danos, quando comparados entre ambos os sexos. A prodigiosina apresentou efeitos genotóxicos evidenciados pelas danificações genômicas observadas em células mononucleadas humanas. Neste sentido, sugere-se estudos futuros para melhor elucidação dos mecanismos de ação alvo-específico da prodigiosina, uma vez que a sugerida aplicação da molécula nas terapias antineoplásicas ainda apresentam riscos de indução de genotoxicidade em células normais.

Palavras-chave: Prodigiosina, genotoxicidade, micronúcleo.

Introdução

A prodigiosina é sintetizada por diversos micro-organismos, tal como a *Serratia marcescens*. Este composto representa a mais nova família de drogas antitumorais. Entre os efeitos resultantes da sua utilização estão a imunossupressão e o bloqueio seletivo dos linfócitos T, B e células NK (Montaner et al., 2001; Pandey et al., 2003). A prodigiosina é um pigmento vermelho da classe dos alcalóides, sendo, estruturalmente, um tripirrol de cadeia linear (pirrol, 3-metoxipirrol, 2-metil-3-amilpirrol), conforme descrito por Guryanov e colaboradores (2013).

Assim como diversos metabólicos secundários bacterianos, a prodigiosina tem adquirido uma importância prática nos últimos anos. Além de sua aplicação farmacêutica, este pigmento tem sido utilizado industrialmente no tingimento de diversos tipos de polímeros, como por exemplo folhas metacrilatos, polimetileno e papel (Mapari et al., 2005; Timbor et al., 2007; Jissa et al., 2011; Krishna et al., 2013). Adicionalmente, estão sendo desenvolvidos métodos que utilizam a prodigiosina para obtenção de produtos derivados de petróleo (Silva et al., 2009).

A prodigiosina é conhecida como um indutor de apoptose em uma variedade de linhagens celulares cancerosas humanas, porém com pouca toxicidade em células normais. Esta característica tem conferido grande vantagem à prodigiosina como um agente anti-câncer (Pandey et al., 2009; Pérez-Tomás e Viñas, 2010). Entre os mecanismos pelos quais a prodigiosina atua está a indução da clivagem do DNA (Pérez-Tomás e Viñas, 2010).

Devido à crescente utilização da prodigiosina como produto farmacêutico (Sigma-Aldrich, CAS Number, 56144-17-3) e o conhecimento gradual sobre a atuação da mesma como um potencial agente anti-câncer (Hsieh et al., 2012), estudos que venham a contribuir para a elucidação dos prováveis mecanismos de atuação da prodigiosina se fazem necessários para a sua melhor aplicação. Esta necessidade se baseia nos poucos dados disponíveis em relação à ação seletiva da prodigiosina em células normais, em termos de avaliação de danificação

genômica. Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo analisar os efeitos de danificação genômica induzida pela prodigiosina em células mononucleadas humanas, por parâmetros de genotoxicidade.

Material e Métodos

Obtenção da prodigiosina

A prodigiosina empregada neste estudo foi obtida a partir do cultivo de *Serratia marcescens* UFPEDA 398. O pigmento vermelho foi purificado por cromatografia em coluna (*Thin Layer Chromatography- TLC*) em seguida, identificado por espectrometria Uv-vis em uma faixa de 200 - 700 nm e posteriormente, caracterizado por espectrofotometria de massa GCMS, segundo Nakashima e colaboradores (2006).

Coleta da amostra

Este estudo foi realizado a partir de linfócitos (10^5 cel / mL) coletados de sangue periférico humano. O cálculo amostral baseou-se em 10 indivíduos hígidos, sendo 5 homens e 5 mulheres com a faixa etária entre 20 e 50 anos. Foram excluídos desta pesquisa, usuários de drogas, indivíduos que faziam uso de medicação, os que apresentavam doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão entre outras. Esta pesquisa foi previamente submetida à avaliação pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Pernambuco, tendo sido aprovado para execução pela plataforma Brasil (CAAEE: 18177413.4.0000.5208).

Foram obtidos aproximadamente 5 mL de sangue venoso periférico total de cada indivíduo, em seringa estéril previamente heparinizada, sendo o mesmo utilizado para todos os tratamentos (diferentes concentrações). As amostras coletadas foram identificadas para

posterior processamento, segundo Neves (2010).

Processamento das amostras

Após a coleta de sangue, as seringas foram deixadas na posição vertical por 2 horas, a fim de se obter a sedimentação das células. Por diferenciação de densidade, foi observada a formação de três camadas, sendo duas celulares e uma formada por plasma sanguíneo. Para isolamento e posterior cultura das células, o plasma sanguíneo foi desprezado e 1 mL da camada celular de aspecto leitoso, contendo os linfócitos, foi transferido para tubos de 5 mL contendo o meio RPMI 1640 (Cultilab), com fitohemaglutinina. Em seguida, as células foram incubadas por 48 horas a 37 °C, segundo Mooreheat e colaboradores (1960).

Cultivo celular

Em relação ao cultivo celular, transcorridas 48 horas do mesmo, 1 mL de prodigiosina, nas concentrações de 0,5; 1,0; 10 e 100 µM/mL foi adicionado às culturas, sendo as mesmas incubadas por mais 24 horas a 37 °C. Como controles positivo e negativo foram utilizados a Doxorrubicina (nas mesmas concentrações aplicadas à prodigiosina) e meio de cultura sem a adição de quaisquer outros agentes, respectivamente.

Teste de micronúcleo

Ao término da incubação, as amostras celulares foram transferidas para tubos de centrífuga e submetidas à centrifugação a 1500 rpm por 6 minutos. Após a centrifugação, o

meio de cultura foi desprezado e as células foram ressuspensas com 1 mL de PBS (tampão fosfato-salino, pH = 7.4). Em seguida, duas gotas da suspensão celular foram transferidas para lâminas previamente lavadas, ainda molhadas e na posição horizontal. Em seguida, estas foram deixadas para secar à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram fixadas com metanol absoluto (P.A) por 5 minutos. Após a lavagem em água corrente, as mesmas foram submetidas à coloração com a utilização do corante Giemsa (Merck), o qual foi depositado de forma uniforme sobre as lâminas, por um tempo médio de 5 minutos, sendo em seguida lavadas com água corrente e novamente secas à temperatura ambiente.

Ensaio cometa

A avaliação da danificação genômica também foi realizada pelo Ensaio Cometa, segundo Singh e colaboradores (1988). Cerca de 15 µL da suspensão celular (10^5 cél/ mL) foi homogeneizada em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LM) previamente aquecida em banho maria a 37 °C. Em seguida, o homogeneizado foi transferido para lâminas de vidros revestidas de agarose padrão, cobertas com lamínulas e incubadas por 10 min sob refrigeração a 4 °C. Após este período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise por 2 horas sob refrigeração a 4 °C. Transcorridas as duas horas, as lâminas foram submetidas a eletroforese (40 V por 20 minutos e a 300 mA). Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de neutralização por 15 minutos e, posteriormente, fixadas em solução de etanol absoluto por 5 minutos. Em seguida, após a secagem, foram armazenadas em geladeira até o momento da coloração. Para coloração foi empregado o corante Gel Red (Biotarget GelRed®), onde 1 µL do corante foi homogeneizado em 1000 µL de água deionizada estéril (1:1000). As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus - Série BX) e em seguida, foram realizadas as contagens celulares onde cerca de 100 células por

indivíduos tratados foram analisados, sendo atribuídos escores de 0 – 4, conforme o nível de dano no nucleóide.

Análise dos dados

A análise para a observação de células micronucleadas foi realizada em microscópio óptico (Olympus BX 60), em objetiva de imersão. Cerca de 1000 células por indivíduo foram analisadas, sendo contabilizadas as células micronucleadas. Foram incluídas as células com um ou mais micronúcleos.

O índice de danos obtidos no Ensaio Cometa foram estabelecidos para todos os tratamentos, exceto para o controle positivo, o qual não foi empregado nesta avaliação.

A homocedasticidade das amostras foram testadas pelo Teste de Bartlett, com nível de significância 0,05. Para as amostras homogêneas foi empregada a ANOVA (nível de significância 0,05), e para aquelas que não se apresentaram homogêneas foi utilizado o teste de Kruskal Wallis (nível de significância 0,05). Para confirmação dos dados foi utilizado o teste *a posteriori* de Tukey (nível de significância 0,05).

A comparação dos efeitos genotóxicos para ambas as metodologias foi estabelecida entre os sexos, utilizando os mesmos parâmetros estatísticos descritos acima.

Resultados

Neste estudo foram observadas formações micronucleares (figura 1), após a exposição às diferentes concentrações de prodigiosina (tabela 1), a qual apresentou efeitos genotóxicos estatisticamente significativos em todos os tratamentos (figura 3). Adicionalmente foi observada uma relação direta com o aumento das concentrações de prodigiosina, onde a maior

média (62,6) de micronúcleos foi apresentada para a maior concentração (100 $\mu\text{M/mL}$) (tabela 1). Este aumento pode ser também observado pelos índices de proporcionalidade estabelecidos entre o controle negativo e as diferentes concentrações de ambas as substâncias (prodigiosina e doxorubicina) (tabela 2). Quando comparados os índices de proporcionalidade entre as concentrações de prodigiosina e doxorubicina observou-se uma relativa constância das proporcionalidades (tabela 2).

Células apoptóticas também foram visualizadas na maior concentração (100 $\mu\text{M/mL}$) de prodigiosina (figura 2). Estas, porém, não foram contabilizadas neste estudo.

Tabela 1. Número e média de células micronucleadas nas diferentes concentrações (μM / mL) de prodigiosina e doxorubicina.

Indivíduos/sexo	Tratamentos								
	Prodigiosina					Doxorubicina*			
	Controle (-)	0,5	1,0	10,0	100,0	0,5	1,0	10,0	100,0
1♀	3	12	28	40	68	16	30	52	75
2♀	4	13	25	37	61	17	30	46	70
3♀	2	8	15	24	52	10	18	30	62
4♀	5	12	29	47	73	16	31	58	77
5♀	2	10	21	35	55	14	28	44	62
6♂	2	8	17	29	48	12	22	36	58
7♂	0	6	21	43	70	17	26	47	73
8♂	1	8	13	32	69	15	22	38	71
9♂	3	12	26	39	77	18	29	45	80
10♂	2	11	20	36	53	16	26	43	66
Médias	2,4	10,0	21,5	36,2	62,6	15,1	26,2	43,9	69,4

* Controle Positivo

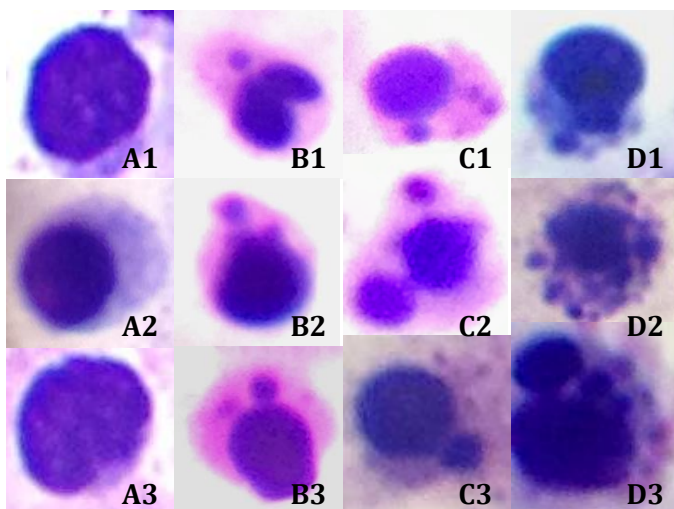


Figura 1. Presença de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico humano após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de prodigiosina. A1-A3 Controle negativo (células com ausência de MN); B1-B3; Presença de MN (concentrações de 0,5 a 1,0 $\mu\text{M}/\text{mL}$); C1-C3 Presença de MN (concentração de 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$); D1-D3 Presença de MN (concentração de 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$).

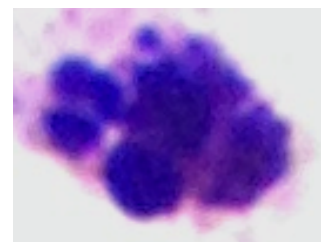


Figura 2. Linfócito de sangue periférico humano apoptótico após 24 horas de exposição observado na concentração de 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

Tabela 2. Índice de Proporcionalidade das médias de células micronucleadas entre os tratamentos.

	Tratamentos								
	Prodigiosina*					Doxorrubicina**			
	Controle	0,5	1,0	10,0	100,0	0,5	1,0	10,0	100,0
Controle		4,16	8,95	15,08	26,08	6,29	10,91	18,29	28,91
0,5*			1,81	3,27	4,81	1,45			
1,0*				1,8	2,65		1,3		
10,0*					1,47			1,19	
100,0*									1,24

**Controle Positivo

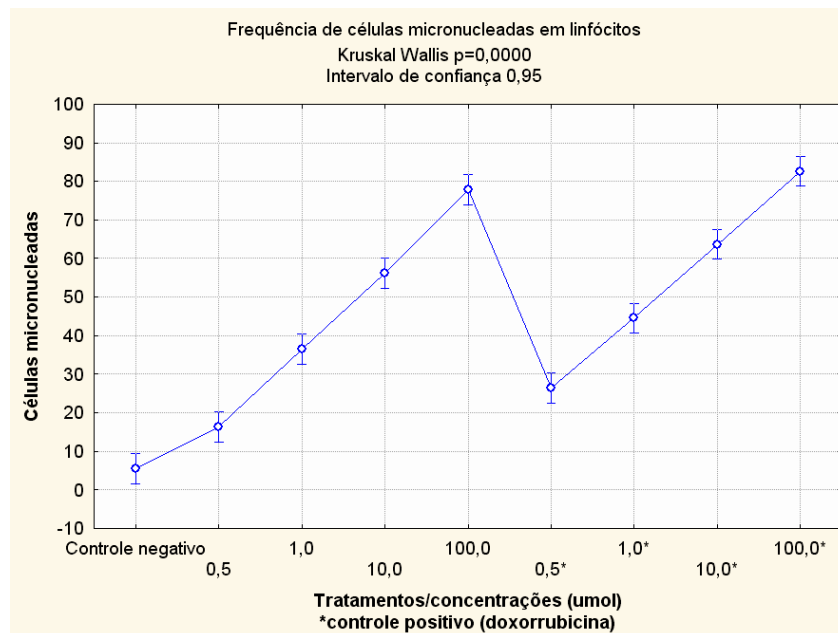


Figura 3. Análise de Kruskal Wallis para as comparações entre as frequências de células micronucleadas nas diferentes concentrações de prodigiosina e tratamentos.

Os resultados do teste de Kruskal Wallis para a frequência de células micronucleadas apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre todas as concentrações de prodigiosina em relação ao controle negativo (figura 3). Não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências de células micronucleadas nas diferentes concentrações de prodigiosina em relação ao controle positivo, exceto na concentração de 0,5 μM / mL em comparação entre ambas as substâncias (figura 3). Estes resultados foram comprovados pelo teste de Tukey (tabela 3).

Tabela 3. Teste de Tukey (*a posteriori*) para a comparação das frequências de células micronucleadas entre os diferentes tratamentos e concentrações (μM / mL) de prodigiosina.

Tratamentos	Prodigiosina*					Doxorrubicina** (Controle +)			
	Controle (-)	0,5	1,0	10,0	100,0	0,5	1,0	10,0	100,0
Controle (-)		0,005428	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132
0,5*	0,005428		0,000132	0,000132	0,000132	0,013612	0,000132	0,000132	0,000132
1,0*	0,000132	0,000132		0,000132	0,000132	0,013612	0,100639	0,000132	0,000132
10,0*	0,000132	0,000132	0,000132		0,000132	0,000132	0,001860	0,172111	0,000132
100,0*	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,000132	0,000132	0,000190	0,721786
0,5**	0,000132	0,013612	0,013612	0,000132	0,000132		0,000132	0,000132	0,000132
1,0**	0,000132	0,000132	0,100639	0,001860	0,000132	0,000132		0,000132	0,000132
10,0**	0,000132	0,000132	0,000132	0,172111	0,000190	0,000132	0,000132		0,000132
100,0**	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,721786	0,000132	0,000132	0,000132	

Valores em negrito = não significativo
Nível de significância 0,05

A análise dos índices de danos obtidos no Ensaio Cometa demonstrou diferenças significativas em relação ao controle negativo para as concentrações 1,0, 10,0 e 100,0 μM de prodigiosina (tabela 4, figura 4, figura 7). Os resultados obtidos no Teste de Tukey confirmaram aqueles obtidos pela ANOVA (tabela 5).

Tabela 04. Índices de danos nas diferentes concentrações ($\mu\text{M}/\text{mL}$) de prodigiosina.

Indivíduos/sexo	Tratamentos				
	Controle (-)	0,5	1,0	10,0	100,0
1♀	1,19	1,28	1,38	1,46	1,77
2♀	1,38	1,42	1,57	1,51	1,88
3♀	1,20	1,31	1,30	1,50	1,65
4♀	1,64	1,70	1,53	1,43	1,55
5♀	1,50	1,57	1,70	1,74	1,75
6♂	1,0	1,53	1,46	1,53	1,60
7♂	1,36	1,74	1,59	1,66	1,68
8♂	1,53	1,61	1,61	1,75	1,81
9♂	1,14	1,20	1,48	1,57	1,65
10♂	1,14	1,71	1,73	1,70	1,81

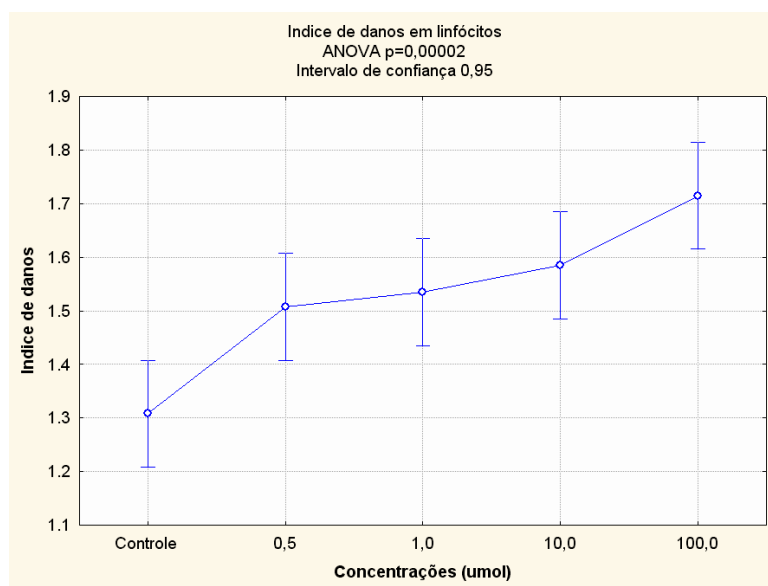


Figura 4. ANOVA para as comparações entre os índices de danos nas diferentes concentrações de prodigiosina.

Tabela 5. Teste de Tukey (*a posteriori*) para a comparação dos índices de danos entre as diferentes concentrações (μM / mL) de prodigiosina.

Tratamentos	Controle (-)	0,5	1,0	10,0	100,0
Controle (-)		0,051051	0,018666	0,002579	0,000138
0,5	0,051051		0,994540	0,800133	0,037345
1,0	0,018666	0,994540		0,952748	0,094928
10,0	0,002579	0,800133	0,952748		0,358197
100,0	0,000138	0,037345	0,094928	0,358197	

Valores em negrito = não significativo

Não foram encontradas diferenças significativas, tanto em relação às frequências de células micronucleadas quanto aos índices de danos, quando comparados entre ambos os sexos (figuras 5 e 6, tabela 6).



Figura 5. ANOVA para as comparações entre os sexos quanto às frequências de células micronucleadas nas diferentes concentrações de prodigiosina.

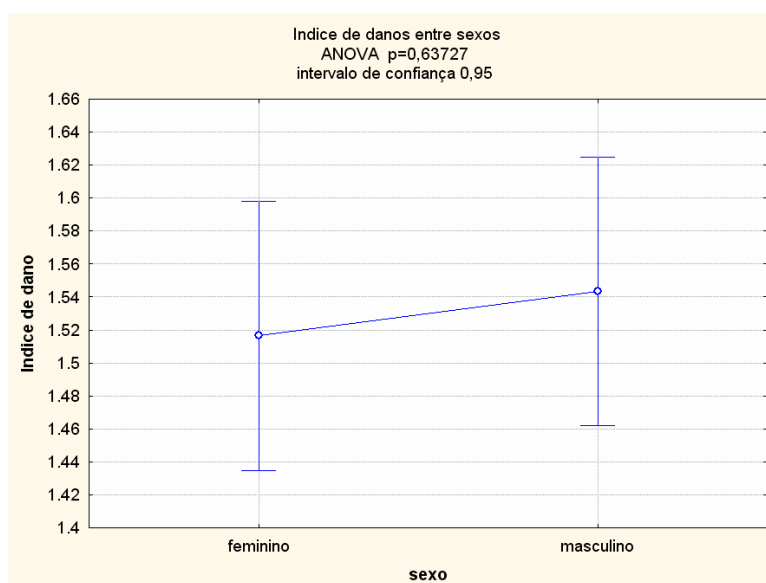


Figura 6. ANOVA para as comparações entre os sexos quanto aos índices de danos nas diferentes concentrações de prodigiosina.

Tabela 6. Teste de Tukey (*a posteriori*) para a comparação entre os sexos em relação às frequências de células micronucleadas e aos índices de danos entre as diferentes concentrações (μM / mL) de prodigiosina.

Sexos	Abordagens Metodológicas			
	Células Micronucleadas		Índice de Danos	
	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Feminino		0,952301		0,637392
Masculino	0,952301		0,637392	

Valores em negrito = não significativo

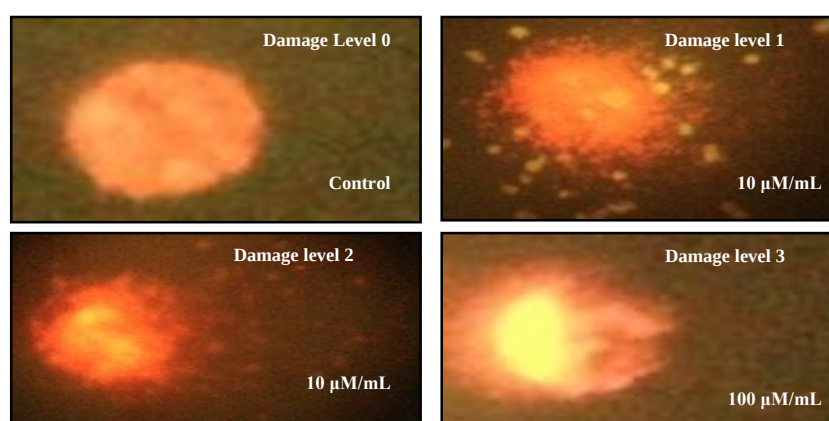


Fig 7. Danos genômicos observados em células mononucleadas normais de sangue periférico humano expostas as diferentes concentrações de prodigiosina (0.5, 1.0, 10.0 and 100.0 μM / mL) em 48 horas.

Discussão

A prodigiosina tem sido considerada um promissor agente anti-câncer devido aos seus mecanismos de ação e características tóxicas para a célula. Entre as vantagens consideradas para a sua utilização no tratamento do câncer, se encontra a sua toxicidade seletiva, atuando somente em células cancerosas (Pérez-Tomáz et al., 2003; Montaner et al., 2005; Lu et al., 2012). Porém, os resultados obtidos no presente estudo apontam para um efeito considerável da prodigiosina em células normais, evidenciado pelo número elevado de células

micronucleadas e índices de danificação significativos (Ensaio Cometa) em todas as concentrações, testadas em linfócitos normais.

O efeito genotóxico da prodigiosina, observado neste estudo, apresentou uma relação dose dependente, onde as maiores frequências de células micronucleadas, em relação ao controle negativo, foram observadas nas maiores concentrações testadas (tabela 1), independentemente do sexo (tabela 6, figuras 5 e 6). Os índices de proporcionalidade também comprovaram esta relação (tabela 2). Foi observado um aumento de expressão de micronúcleos na ordem de 4 vezes maior para a menor concentração (0,5 $\mu\text{M/mL}$) de prodigiosina testada, e cerca de 26 vezes para maior concentração (100,0 $\mu\text{M/mL}$). Apesar das diferenças significativas apresentadas quanto aos efeitos genotóxicos (frequência de micronúcleos) da prodigiosina em relação ao controle positivo (doxorrubicina), quando ambas as drogas foram comparadas ao grupo controle negativo, as mesmas demonstraram um efeito maior de danificação genômica nos linfócitos analisados. Porém, na comparação com o controle positivo, a prodigiosina demonstrou um efeito inferior ao da doxorrubicina na concentração 0,5 $\mu\text{M/mL}$, como mostraram as análises pelo teste de Tukey (tabela 3) e as médias apresentadas (tabela 1). A similaridade de efeito dose-dependente de ambas as drogas, provavelmente se deve à similaridade estrutural das mesmas.

Prodigiosina e Doxorrubicina são agentes intercalantes do DNA. Devido à estrutura química planar destas moléculas, as mesmas são capazes de interagir com a molécula de DNA e, desta maneira, interferir na estabilidade desta molécula (Montaner et al., 2005).

Quatro mecanismos de ação da prodigiosina são considerados para sua atuação como agente anti-câncer: (i) indução da acidificação intracelular, (ii) indução da clivagem do DNA por inibição das topoisomerases I e II, (iii) modulação da atividade MAPK, e (iv) inibição da progressão do ciclo celular (Perez-Tomás e Viñas, 2010; Hsieh et al, 2012). Entre estes modos

de ação, os três primeiros podem levar à indução da apoptose (Williamson et al., 2006; Soto-Cerrato et al., 2007).

Considerando o mecanismo de ação da prodigiosina relacionado à clivagem do DNA, a sua ligação à dupla fita, segundo Montaner e colaboradores (2005), inibe a ação das DNAs-topoisomerasas I e II, transformando essas enzimas essenciais em agentes letais de danificação do DNA (Turner e Denny, 1996; Montaner et al., 2005; Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Ho et al., 2009; Perez-Tomás e Viñas, 2010). A prodigiosina fixa os complexos de clivagem Enzima-DNA, resultando em quebras na molécula de DNA (Montaner et al., 2005). Tais fragmentos de DNA, potencialmente, podem originar micronúcleos em células em divisão, como apontam os resultados obtidos neste estudo (figura 1). Esta fragmentação também pode ser observada pelas diferenças significativas dos Índices de Danos observadas na relação das concentrações de prodigiosina avaliadas e o controle negativo (tabelas 4 e 5, figura 4).

Os danos na dupla fita de DNA, como consequência da inibição das topoisomerasas pela prodigiosina, são independentes do processamento da cromatina relacionado ao processo apoptótico induzido pela mesma (Campás et al., 2003; Montaner et al., 2005; Perez-Tomás e Viñas, 2010). Esta relação independente dos dois efeitos da prodigiosina acima citados pode ser evidenciada no presente estudo. Células apoptóticas (figura 2) foram observadas somente na concentração de 100,0 $\mu\text{M/mL}$ de prodigiosina, enquanto a danificação genômica foi observada em todas as concentrações avaliadas (tabelas 1 e 4). A presença de células apoptóticas observadas na maior concentração (100,0 $\mu\text{M/mL}$) está parcialmente de acordo com as observações de Williamson et al. (2006) e Soto-Cerrato et al. (2007). Tais autores observaram que em baixas concentrações (não-citotóxicas), a prodigiosina provoca o bloqueio do ciclo celular, enquanto que, em concentrações maiores, a mesma induz a apoptose. A supressão do ciclo celular não foi avaliada neste estudo.

Adicionalmente, os danos genômicos observados em todas as concentrações, em ambas as metodologias empregadas, provavelmente também podem ser decorrentes da indução de danos oxidativos no DNA pela prodigiosina (Melvin et al., 2000; Montaner et al., 2005).

Ainda são escassos os dados que evidencia os efeitos genotóxicos da prodigiosina, principalmente em células normais, enfatizando o potencial de inovação biotecnológico desta pesquisa.

Os resultados obtidos por Larazo e colaboradores (2002) não demonstraram efeitos mutagênicos e genotóxicos significativos da prodigiosina, respectivamente, a partir do teste de Ames em *Salmonella typhimuriun* e em linhagens linfocíticas L51718y (obtidas de linfomas de ratos) pela contagem de micronúcleos. Guryanov e colaboradores (2012) também não encontraram efeitos genotóxicos significativos da prodigiosina em *Salmonella typhimuriun* e em eritrócitos periféricos de camundongos.

Contrariamente aos resultados obtidos pelos autores acima citados, um elevado efeito genotóxico foi observado nos linfócitos analisados neste estudo. A prodigiosina mostrou significativa clastogenicidade para estas células em questão, demonstradas por ambas as metodologias. Tendo em vista que a prodigiosina pode causar quebras em ambas as fitas de DNA, e que, por razões óbvias, tal danificação é mais difícil para a célula reparar (Montaner et al., 2005), células que sejam submetidas à ação desta droga podem ser comprometidas tanto em termos de viabilidade (por indução de apoptose) quanto dos efeitos deletérios da danificação genômica estabelecida.

O potencial terapêutico da prodigiosina contra o câncer já é bastante reconhecido pela comunidade médico-científica, principalmente pela sua atuação direta no DNA, levando à supressão do ciclo celular e apoptose das células cancerosas (Hsieh et al., 2012; Lu et al., 2012). Porém, os efeitos genotóxicos observados neste estudo sugerem uma ação não seletiva da

prodigiosina em relação às células normais. Portanto, novos estudos do efeito desta droga em diversas linhagens de células normais deverão ser realizados para a ratificação dos efeitos genotóxicos não seletivos da mesma, assegurando, assim, uma melhor eficiência e minimização de riscos para a sua utilização.

Conclusão

A prodigiosina apresentou efeito genotóxico significativo em linfócitos normais humanos, expostos durante 24 horas a diferentes concentrações do pigmento. Tal efeito foi evidenciado pelo aumento da frequência de micronúcleos e índice de danos nas células analisadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe técnica responsável, a Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio físico e estrutural, cedendo seus laboratórios para realização dos ensaios e aos órgãos de fomento de fundamental importância como CNPq e CAPES.

Referências bibliográficas

- Campás C, Dalmau M, Montaner B, Barragán M, Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Pérez-Tomás and Gil J. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003. 17, 746-750.
- Hsieh, H.Y, Shieh, J. J, Chen, C.J, Pan, M.Y, Yang, S.Y, Lin, S.C, Chang, J.S, Lee, A.Y.L and Chang, C.C. Prodigiosin down-regulates SKP2 to induce p27KIP1 stabilization and antiproliferation in human lung adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*. (2012) 166 2095–2108.

Guryanov I.D, Karamova N.S, Yusupova O.I, Gnezdilov and Koshkaranova L.A. Bacterial Pigment Prodigiosin and Its Genotoxic Effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2013. 39, 121-128.

Ho TF, Peng, YT, Chuang SM, Lin SC, Feng BL, Lu CH, Yu WJ, Chang JS, Chang CC. Prodigiosin down-regulates survivin to facilitate paclitaxel sensitization in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235: 253- 26, 2009.

Jissa GK, Soorej MB, Elyas KK, Chandrasekaran M. Prodigiosin from marine bacterium: Production, Characterization and Application as dye in textile industry. *Int. J. Biotechnol. Biochem*. 2011. 7:155-191.

Krishna J.G, Jacob A, Kurian P, Elyas K.K, Chandrasekaran M. Marine bacterial prodígios in as dye for rubber latex, polymethyl methacrylate sheets and paper. *African Journal of Biotechnology*. 2013 Vol. 12(17), pp. 2266 -2269.

Lazaro JE, Nitchou J, Predicala RZ, Mangalindan GC, Nessler F, Marzin D, Concepcion GP, Diquet B. Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial in vivo and non-mutagenic in vitro. *J Nat Toxins*. 2002 Dec;11(4):367-77.

Lu C.H, Lin S.C, Yang S.Y, Pan M.Y, Lin Y.W, Hsu C.Y, Wei Y.H, Chang J.S, Chang C.C. Prodigiosin-induced cytotoxicity involves RAD51 down-regulation through the JNK and p38 MAPK pathways in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology Letters*. 2012. 212, 83-89.

Mapari SAS, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2005. 16:109-238.

Melvin, M.S., et al. Double-strand DNA cleavage by copper prodigiosin. *Journal of the American Chemical Society*. 2000. 122.26: 6333-6334.

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*. 1960. 20: 613-615.

Montaner B, Perez-Tomas R. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci*. 2001. 68:2025-2036.

Montaner B, Castillo-Ávila W, Martinell M, Ollinger R, Ayamami J, Gitalt E and Pérez-Tomáz, R. DNA Interaction and Topoisomerase I and II Inhibition Properties of the Anti-Tumor Drug Prodigiosin. *Toxicological Sciences*. 2005. 85, 870-879.

Nakashima T, Miyazaki Y, Matsuyama Y, Muraoka W, Yamaguchi K, Oda T. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γ-proteobacterium*. *App. Microbiol. Biotechnol*. 2006. 73, 684–690.

Palchaudhuri, R, Hergenrother, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current opinion in biotechnology*. 2007. v. 18, n. 6, p. 497-503.

Pandey R, Chander R, Sainis KB. A novel prodigiosin -like immunosuppressant from an alkalophilic *Micrococcus* sp. *Int. Immunopharmacol*. 2003. 3:159-167.

Pandey R, Chander R, Sainis KB. Prodigiosins as anti-cancer agents: living upto their name. *Curr Pharm Des*. 2009. 15: 732–741.

Pérez-Tomáz, Ricardo et al. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochemical pharmacology*. 2003. v. 66, n. 8, p. 1447-1452.

Pérez-Tomás R, Viñas M. New insights on the antitumoral properties of prodiginines. *Curr Med Chem*. 2010. 17: 2222–2231.

Soto-Cerato V, Viñals F, Lambert JR, Kelly JA e Perez-Tomas R. Prodigiosin induces the proapoptotic gene NAG-1 via glycogen synthase kinase-3beta activity in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2007. 6: 362–369.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for the quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988. 175:184-191.

Tibor C. Liquid chromatography of natural pigments and synthetic dyes. First ed. Elsevier, UK. *Included in series J. Chromatogr. Lib*. 2007. 71:1-602.

5. Conclusão

5. Conclusão

O pigmento vermelho, natural, sintetizado por *Serratia marcescens* UFPEDA 398 foi caracterizado como sendo à prodigiosina reportada na literatura, a qual diversas atividades biológicas têm sido atribuídas, inclusive antimicrobiana.

Quanto a atividade antimicrobiana, a prodigiosina mostrou-se efetiva frente a *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 e *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07. Em adicional, cepas de *Staphylococcus aureus* ORSA apresentaram significativa sensibilidade a prodigiosina. Neste sentido, a prodigiosina é um pigmento natural com potencial atividade antimicrobiana, sugerindo a sua aplicação nas antibióticos terapias dirigidas as cepas de *Staphylococcus aureus* ORSA.

A prodigiosina apresentou citotóxicidade as linhagens tumorais sendo evidenciado também indução de apoptose nas linhagens NCHI 279 e Hep2 e resistência da HL-60 ao pigmento. Contudo, a pesar da potencial atividade citotóxica da prodigiosina são necessários a realização de estudos genotóxicos futuros que elucidem melhor tais mecanismos de ação e sua ação alvo-específica.

A prodigiosina apresentou efeito genotóxico significativo em células mononucleadas normais de sangue periférico humano, expostos a 48 horas a diferentes concentrações da substância. Tal efeito foi evidenciado pelo aumento da frequência de micronúcleos e índice de danos nas células analisadas.

Quanto a danificação genômica em linhagens tumorais foi observado que a a prodigiosina apresentou danificação genômica em linhagens tumorais. Estes dados corroboram com o potencial de ação antitumoral da prodigiosina. Entretanto, demonstra também a preocupação com seu alvo-específico de ação, pois foram evidenciados também efeitos

genotóxicos para as células normais. Logo, sugerindo estudos futuros que elucidem melhor possíveis alvos de ação da prodigiosina visando potencializar a ação antineoplásica desta droga e a sua aplicação nas terapias antitumorais.

6. Anexos

Genotoxicidade comparativa do antineoplásico Doxorubicina em linhagens de células tumorais e normais

Lapenda, J.C.L.¹, Adam, M.L.², Nascimento, S.C.³

¹ Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Artigo a ser submetido a revista *Toxicology Letters*

Autor para correspondência

²Jeanne Cristina Lapenda Lins, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife-PE, Brasil. Fone.: 81-2126 8346; Ramal: 207 ou (81) 8859 4299.
E-mail: jeannecantalice@gmail.com

Genotoxicidade comparativa do antineoplásico Doxorrubicina em linhagens de células tumorais e normais

Lapenda, J.C.L.¹, Adam, M.L.², Nascimento, S.C.³

¹ Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Resumo

A Doxorrubicina (Dox), conhecida também pelo nome comercial Adriamicina cuja fórmula química é $C_{27}H_{29}NO_{11}$ e peso molecular correspondente a $543,46 \text{ g/mol}$, é um antibiótico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius* e pertencente a classe das antraciclinas (ANT), sendo amplamente utilizado na quimioterapia do câncer. A Doxorrubicina tem se mostrado efetiva no tratamento contra o câncer em humanos como as leucemias, linfomas e vários tipos de tumores sólidos. Neste sentido, a Doxorrubicina se destaca pela sua importância dentro da terapêutica do câncer, justificando os estudos realizados referente as suas diversas funções biológicas. Contudo, apesar da doxorrubicina ser conhecida pelo seu potencial citotóxico e antitumoral e já ser empregada nas terapias contra o câncer, poucos são os estudos que descrevem o seu potencial efeito genotóxico de ação, o que despertou o objetivo de interesse na realização deste investigação, uma vez que algumas poucas evidências descrevem danificações genômicas associadas a droga. As linhagens tumorais NCIH-292, MCF-7, HL-60 e BGМК (célula normal) foram tratadas com diferentes concentrações de doxorrubicina (0,1; 0,2 e 0,4 $\mu\text{g/mL}$) em 48 horas. A avaliação genotóxica foi feita pelos ensaios cometa (*Comety Assay*) e micronúcleo (*Micronuclei Assay*). Foi observada significativa atividade citotóxica para a doxorrubicina após 72 horas de exposição das células tumorais e normais com base na mensuração da dose citotóxica IC_{50} ($IC_{50} = 0,2 \mu\text{g/mL}$). Quanto aos efeitos genotóxicos, foram observados frequência de micronúcleos em todas as linhagens tratadas com a dox em diferentes concentrações. Para a concentração com base na IC_{50} de $0,2 \mu\text{g/mL}$ foram achados as seguintes frequências HL-60 (0,0430), NCIH 270 (0,0440), MCF-7 (0,0210) e BGМК (0,0240). A doxorrubicina é um fármaco que apresenta um potencial citotóxico e genotóxico frente as linhagens tumorais. Contudo, observa-se também que a Dox induziu significativo efeito genotóxico a células normais. Logo, os resultados aqui apresentados sugerem cautela quanto ao tratamento terapêutico genotóxico da doxorrubicina, tendo em vista as diferentes respostas ao dano genômico apresentadas pelas linhagens tumorais e a maior danificação no DNA observadas na linhagem normal (BGМК).

Palavras-Chave: Doxorrubicina. Ensaio cometa. Teste de micronúcleo. Células tumorais.

Introdução

A Doxorubicina (Dox), conhecida também pelo nome comercial Adriamicina, cuja fórmula química é $C_{27}H_{29}NO_{11}$ e peso molecular correspondente a $543,46 \text{ g/mol}^{-1}$, é um antibiótico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius*. A Dox destaca-se não só por ter sido uma das primeiras classes de antraciclinas descobertas, mas pelo seu amplo espectro de ação antineoplásica. A Dox, administrada por via intravenosa, se liga extensivamente a diversas proteínas, sem ultrapassar as barreiras hematoencefálicas, e sofre biotransformação rápida no fígado, sendo excretada pela bile em sua forma íntegra (50%) e na forma de doxorubicinol (23%). Apenas 10% são eliminados pela urina, dos quais metade como metabólito (Souza et al., 2009).

A ação antitumoral da Dox tem sido evidenciada em diversos estudos, envolvendo vários tipos de câncer, tais como as leucemias, linfomas e vários tipos de tumores sólidos. Segundo Datta et al., (2013), a Dox induz efeito citotóxico inicial em células hematopoiéticas. Em colaboração, Souza et al., (2009) e Nayak et al., (2013) e colaboradores demonstraram o efeito citotóxico da Dox, a partir da indução de processos oxidativos em linhagens H9c2 de cardiomioblastoma. Yurtuc et al., (2014), demonstraram a genotoxicidade e citotoxicidade da Dox em linhagens tumorais hepáticas (HepG2), após o tratamento do câncer hepático humano. Manjanatha et al., (2014), descreveram os efeitos genotóxicos da Dox em linhagens de células extraídas de diversos órgãos de ratos F344.

Atualmente, a Dox tem sido empregada no tratamento dos cânceres de mama, pulmão, estômago, testículos, bladder, tireóide, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, leucemia aguda, sarcoma do tecido mole, tumor de Wilm, neuroblastoma, e diversos tipos de mielomas (Cancerquest, 2013; Miskovic et al, 2013).

A característica antineoplásica da Dox é devido às suas propriedades, entre outras, de inibição da síntese de DNA, ligação e alquilação desta molécula, interferência na separação da

dupla fita de DNA, inibição das topoisomerase I e II, indução de radicais livres e peroxidação lipídica (Gewirtz, 1999; Chen et al., 2007; Takemura and Fujiwara, 2007; Gianni et al., 2008; Menna et al., 2008; Manjanatha et al., 2014).

O potencial citotóxico/genotóxico da Dox em linhagens tumorais encontra-se associado a sua capacidade de inibir as enzimas topoisomerasas I (topo I) e II (topo II), as quais são responsáveis pela manutenção das propriedades topológicas corretas do DNA (Baguley et al., 1998; Berger, 1998; Marverti et al, 2008). Agentes intercalantes, como a Dox, são capazes, como consequência da sua ligação ao DNA, de provocar danos nesta molécula, que estão intimamente relacionados com níveis de citotoxicidade (Dhawan et al, 2003; Marverti et al, 2008).

Apesar da Dox estar sendo utilizada amplamente no tratamento do câncer, a observação de seus efeitos colaterais em células normais, principalmente em cardiomiócitos, tem levado ao questionamento de sua intensa utilização clínica (Kalyanaraman et al, 2002; Wang et al, 2013). Por esta razão, o presente estudo teve como objetivo quantificar diferencialmente a danificação genômica induzida em diferentes linhagens tumorais e células normais.

Material e Métodos

Linhagens tumorais e condições de cultura

Foram empregadas neste estudo as seguintes linhagens tumorais: NCIH-292 (Carcinoma mucoepidermoide de pulmão), MCF-7 (Adenocarcinoma de mama), e HL-60 (Leucemia promielocítica humana). Como controle foi utilizada uma linhagem normal extraídas de macaco, BGMK. Todas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Culturas de Células e Ensaio farmacológicos, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. As linhagens foram cultivadas (2×10^5 células/mL) em frascos ($25 \text{ cm}^2/60 \text{ mL}$) para cultura de tecidos, contendo o meio para o cultivo

celular, Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (DMEM, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM e incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Teste de viabilidade celular e atividade citotóxica nas linhagens tumorais

A viabilidade celular e a atividade citotóxica da Doxorrubicina (Dox) em linhagens de células tumorais foram realizadas pelo teste colorimétrico MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide)], após 72 horas de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* desenvolvido por Mosmann et al., (1983) e, posteriormente, adaptado por Alley et al., (1987), para estimar a proliferação e a sobrevivência celular. O teste baseia-se na análise de enzimas celulares que reduzem o corante tetrazólico (MTT) a sua forma insolúvel (o formazan), evidenciado pela cor púrpura e que, posteriormnte, é mensurado pela absorbância em nm. Inicialmente, as células foram cultivadas na concentração de 10⁵ células/mL (Bezerra et al., 2008). O controle negativo foi estabelecido pela ausência da Dox no meio de cultura RPMI 1640. A Dox foi previamente dissolvida em DMSO e, em seguida, diluída em série (25 – 0,3 µg/mL) em meio RPMI 1640 e transferida para placa de 96 poços (100 µL/poço). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 hora, em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e incubadas por mais 3 horas. Após a dissolução do precipitado com DMSO puro, foi realizada a leitura das placa em espectrofotômetro de placas a 595 nm e em seguida, mensurados a CL₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad, Intiuitive Software for Science, San Diego, CA).

Efeito genotóxico da doxorrubicina em linhagens de células tumorais

Os efeitos genotóxicos da doxorrubicina foram avaliados pelos Ensaio Cometa e Micronúcleo, segundo o método descrito por Singh et al., (1988), Tice et al., (2000) e Fenech et al., (1985), respectivamente. Cerca de 2×10^5 células por mL das linhagens NCIH- 292, Hep-2, MCF-7 e HL-60 foram cultivadas em microplacas de 24 poços em meio (1 mL/poço) Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (DMEN, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM e incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ , e incubados por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionadas as soluções de doxorrubicina nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4 µg/mL. Após este período, o meio foi aspirado e as células foram lavadas com 300 µL de solução tampão (PBS, pH 7,2) e, em seguida, tratadas com 300 µL de tripsina/ EDTA. Posteriormente, para inativação da tripsina foi adicionado 600 µL de meio DEMEN seguindo a aspiração das amostras, as quais foram transferidas para tubos de Eppendorf para posterior processamento. O processamento iniciou com as amostras sendo lavadas com 60 µL de solução tampão (PBS, pH igual a 7,2) e centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos. Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura (RPMI 1640) sem a adição de quaisquer outros agentes. Após a centrifugação, o meio de cultura foi desprezado e as células foram ressuspensas com 60 µL de PBS. Em seguida, duas gotas da suspensão celular foram transferidas para lâminas previamente lavadas, ainda molhadas e na posição horizontal. As lâminas foram deixadas para secar à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto (P.A) por 5 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente e submetidas à coloração com a utilização do corante Giemsa (Merck), o qual foi depositado de forma uniforme sobre as lâminas, por um tempo médio de 5 minutos. Após a coloração, as lâminas foram novamente lavadas com água corrente e postas para secarem à temperatura ambiente.

A avaliação da danificação genômica foi realizada pelo Ensaio Cometa, segundo Singh et al., (1988). Cerca de 15 µL da suspensão celular previamente tratada com doxorubicina em diferentes concentrações (0,1; 0,2 e 0,4 µg/mL) foi homogeneizada em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*LM*) previamente aquecida em banho maria a 37 °C. Em seguida, o homogeneizado foi transferido para lâminas de vidros revestidas de agarose padrão, cobertas com lamínulas e incubadas por 10 minutos sob refrigeração a 4 °C. Após este período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise por 2 horas sob refrigeração a 4 °C. Transcorridas as duas horas, as lâminas foram submetidas a eletroforese (40 V por 20 minutos e a 300 mA). Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de neutralização por 15 minutos e, posteriormente, fixadas em solução de etanol absoluto por 5 minutos. Após a secagem, as lâminas foram armazenadas em geladeira até o momento da coloração. Para coloração foi empregado o corante Gel Red (Biotarget GelRed®), onde 1 µL de corante foi homogeneizado em 1000 µL de água deionizada estéril (1:1000). As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus -Série BX) e em seguida, foram realizadas as contagens celulares onde cerca de 100 células por indivíduos tratados foram analisados, sendo atribuídos escores de 0 – 4, conforme o nível de dano no nucleóide.

Análises estatísticas

Em relação aos índices e frequências de danos, bem como a frequência de células micronucleadas foram comparadas entre os tratamentos pelo Teste Qui-Quadrado (X^2), com nível de significância 0,05. Os índices de proporcionalidade de danos (IP) foram calculados para as diversas comparações.

Resultados

Foi observada significativa atividade citotóxica para a doxorrubicina após 72 horas de exposição das células tumorais e normais com base na mensuração da dose citotóxica IC_{50} ($IC_{50} = 0,2 \mu\text{g/mL}$) (tabela 1).

Tabela 1. Mensuração da IC_{50} para a prodigiosina frente as linhagens de células tumorais e normais (BGMK).

Linhagem celular	Drogas IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	Prodigiosina	Doxorrubicina
NCHI-292	3,6	0,2
BGMK	3,4	0,7
MCF-7	5,1	0,2
HL 60	1,7	0,2

As comparações dos índices (ID) e frequências de danos (FD) obtidos pelo Ensaio Cometa, estabelecidas pelo X^2 entre os controles de cada tratamento apresentaram diferenças significativas em ambos os parâmetros, exceto para as FDs das linhagens NCIH279 e MCF7 para a concentração $0,1 \mu\text{g/mL}$ em relação aos respectivos controles, e para o ID de MCF7 nesta mesma comparação (tabela 2).

Tabela 2. Índice e frequência de danificação genômica observadas em linhagens tumorais e normais (BGMK), após exposição em 48 horas a diferentes concentrações de doxorubicina (0,1, 0,2, 0,4 µg/mL), e os valores de *p* relativos às comparações com os respectivos controles de cada linhagem, obtidos pelo X²

[C] µg / mL	Linhagens celulares															
	HL 60				NCIH 279				MCF 7				BGMK			
	ID	<i>p</i>	FD	<i>p</i>	ID	<i>p</i>	FD	<i>p</i>	ID	<i>p</i>	FD	<i>p</i>	ID	<i>p</i>	FD	<i>p</i>
0,0	8		7		12		10		9		8		8		6	
0,1	26	<i>p</i> <0,001	22	<i>p</i> <0,001	21	<i>p</i> <0,01	16	<i>p</i> >0,05*	14	<i>p</i> =0,1*	11	<i>p</i> >0,05*	32	<i>p</i> <0,001	21	<i>p</i> <0,001
0,2	52	<i>p</i> <0,001	37	<i>p</i> <0,001	35	<i>p</i> <0,001	26	<i>p</i> <0,001	29	<i>p</i> <0,001	22	<i>p</i> <0,01	56	<i>p</i> <0,001	40	<i>p</i> <0,001
0,4	80	<i>p</i> <0,001	52	<i>p</i> <0,001	68	<i>p</i> <0,001	49	<i>p</i> <0,001	42	<i>p</i> <0,001	29	<i>p</i> <0,001	76	<i>p</i> <0,001	52	<i>p</i> <0,001

ID (Índice de dano genômico); FD%: Frequência de dano genômico; Nível de significância 0,05; [C] (concentrações de doxorubicina).

Tabela 3. Índices de danificação genômica observados em linhagens tumorais e normais (BGMK), após exposição em 48 horas a diferentes concentrações de doxorubicina (0,1, 0,2, 0,4 µg/mL), os índices de proporcionalidade de danos e os valores de *p* relativos às comparações com o controle (BGMK), obtidos pelo X²

[C] µg / mL	Linhagens celulares										
	HL 60			NCIH 279			MCF 7			BGMK	
	ID	IP	<i>p</i>	ID	IP	<i>p</i>	ID	IP	<i>p</i>	ID	
0,0	8	1,0	<i>p</i> >0,05	12	1,5	<i>p</i> >0,05	9	1,1	<i>p</i> >0,05	8	
0,1	26	1,2	<i>p</i> >0,05	21	1,5	<i>p</i> <0,05*	14	2,3	<i>p</i> <0,001**	32	
0,2	52	1,1	<i>p</i> >0,05	35	1,6	<i>p</i> <0,001**	29	1,9	<i>p</i> <0,001**	56	
0,4	80	1,05	<i>p</i> >0,05	68	1,1	<i>p</i> >0,05	42	1,8	<i>p</i> <0,001**	76	

ID (Índice da dano genômico); IP (Índice de Proporcionalidade de Danos; Nível de significância 0,05; * valor significativo; [C] (concentração e doxorubicina)

Quando a comparação foi realizada entre os tratamentos e a linhagem celular normal (BGMK), os IDs não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na maioria das concentrações avaliadas em todas as linhagens estudadas (tabela 3). As linhagens NCIH279 e MCF7 apresentaram valores significativos, porém esses valores se referem à uma diferença menor de danificação em relação ao controle, como demonstraram os índices de proporcionalidade de danos (IP) (tabela 3). Resultados similares foram observados para o parâmetro FD (tabela 4).

Os números, as frequências de células micronucleadas e os índices de proporcionalidade de cada linhagem/tratamento podem ser observados na tabela 5. As comparações estatísticas para este parâmetro de danificação demonstraram valores significativos a favor das linhagens tumorais referentes às células de MCF7 na concentração 0,4 µg/mL, e uma danificação maior de NCIH279 e HL60, tanto na concentração 0,2 µg/mL quanto na de 0,4 µg/mL (tabela 6). O favorecimento ou o desfavorecimento das células tumorais podem ser observados pelos números de células micronucleadas e os índices de proporcionalidade de danos na tabela 5.

Tabela 4. Frequências de danificação genômica observadas em linhagens tumorais e normais (BGMK), após exposição em 48 horas a diferentes concentrações de doxorrubicina (0,1, 0,2, 0,4 µg/mL), os índices de proporcionalidade de danos e os valores de *p* relativos às comparações com o controle (BGMK), obtidos pelo X²

[C] µg / mL	Linhagens celulares									
	HL 60			NCIH 279			MCF 7			BGMK
	FD	IP	<i>p</i>	FD	IP	<i>p</i>	FD	IP	<i>p</i>	FD
0,0	7	1,1	<i>p</i> >0,05	10	1,7	<i>p</i> >0,05	8	1,3	<i>p</i> >0,05	6
0,1	22	1,3	<i>p</i> >0,05	16	1,3	<i>p</i> >0,05	11	1,9	<i>p</i> <0,05*	21
0,2	37	1,08	<i>p</i> >0,05	26	1,5	<i>p</i> <0,05*	22	1,8	<i>p</i> <0,001**	40
0,4	52	1,0	<i>p</i> >0,05	49	1,06	<i>p</i> >0,05	29	1,8	<i>p</i> <0,001**	52

ID (Frequência de dano genômico); IP (Índice de Proporcionalidade de Danos; Nível de significância 0,05; *valores significativos; **valores altamente significativos; [C] (concentração de doxorrubicina).

Discussão.

A doxorrubicina apresentou pontencial efeito citotóxico as células tumorais e normais demonstrando ser um potente antitumoral cujo alvo de ação é inespecífico. A eficiência das diversas drogas anticancer depende da capacidade que estas tenham em induzir danos ao DNA e consequentemente, gerar lesões irreparáveis que induzam aos mecanimos de morte celular (Guerreiro et al., 2013). Todavía, sabe-se que as células cancerígenas geralmente, apresentam resistências a estes compostos antitumorais por apresentarem um mecanimos de reparação de dano genômico altamente eficiente. Neste sentido, diversos estudos tem sido desenvolvido para identificação de novos fármacos que apresentem efeito inibitório dos mecanismos de reparação de danos ao DNA. (Gewitz et al., 1999).

Tabela 5. Números, frequências e Índices de Proporcionalidade de Danos observados em linhagens tumorais e normais (BGMK), após exposição em 48 horas a diferentes concentrações de doxorubicina (0,1, 0,2, 0,4 µg/mL)

[C] µg / mL	Linhagens celulares										
	BGMK			MCF 7			NCIH 279			HL 60	
	CM	FMN	CM	IP	FMN	CM	IP	FMN	CM	IP	FMN
0,0	4	0,0040	6	1,5	0,0060	4	1,0	0,0040	6	1,5	0,0060
0,1	20	0,0200	14	1,4	0,0140	20	1,0	0,0200	20	1,0	0,0200
0,2	24	0,0240	21	1,1	0,0210	44	1,8	0,0440	43	1,7	0,0430
0,4	37	0,0370	33	1,1	0,0330	76	2,05	0,0760	68	1,8	0,0680

CMN (Células micronucleadas) ; FMN (Frequência de micronúcleos); IP (Índice de proporcionalidade de Danos); [C] (concentração de doxorubicina).

Foi observado que a doxorubicina apresentou um forte efeito citotóxico para as células tumorais e normais na concentração de 0,2 µg/mL (IC₅₀ 0,2 µg/mL). Em colaboração, com estes achados Guryanov et al., (2013) mensura uma similar atividade citotóxica na concentração de 1,0 µg/mL.

A doxorubicina tem sido empregada nas terapias contra neoplasias hematológicas e tumores sólidos como o câncer de mama (Minetri et al., 2004).

O múltiplo mecanismos de ação da doxorubicina ainda não encontra-se totalmente elucidado. Contudo, observa-se que a droga apresenta uma efetiva ação de indução de danos ao DNA, principalmente por atuar inibindo a enzima topoisomerase II, induzir ligação e alquilações no DNA, interagir no mecanismo de estabilização da molécula de DNA a partir de

alteração das ligações entre os pares de bases de nucleotídeos, resultando em quebras cromossômicas e formação de fragmentações de DNA com consequente ativação da proteína ROS (proteína reativa com o oxigênio) que produz a oxidação do DNA na presença de anions superóxidos (O^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Spencer et al., 2008).

Em colaboração com os nossos achados a ação citotóxica da doxorrubicina tem sido descrita por Wu et al., (2002), demonstrando efetiva citotoxicidade para câncer de próstata, por Gallego et al., (2006), demonstrando sua ação citotóxica em câncer de ovário, por Escobar et al., (2009), descrevendo a ação tóxica evidenciada pela indução de mutações e eventos de recombinação gênica em células somáticas e por Campos et al., (2012), relatando o stress oxidativo celular durante a quimioterapia com a doxorrubicina. Esta atividade citotóxica correlacionada a indução de danos no DNA e consequente ativação do mecanismo de morte celular, apoptose, sugere que a droga também apresenta significativa atividade genotóxica. Neste sentido, também foram avaliados seus efeitos genotóxicos.

A doxorrubicina têm se mostrado um eficiente agente indutor de danificação genômica, característica esta de grande importância na luta contra o câncer. (Wang et al, 2012). Entretanto, concomitantemente à sua utilização como um agente antitumoral, esta droga pode causar danos significativos em células normais (Carvalho et al, 2009; Manjanatha et al., 2014), como demonstraram os resultados obtidos neste estudo.

As avaliações estabelecidas pelos três parâmetros abordados neste estudo, mostraram que, apesar da doxorrubicina apresentar um efeito de danificação genômica dose-dependente em todas as linhagens celulares, a linhagem controle (BGMK) apresentou valores maiores e/ou iguais às linhagens tumorais. Assim, os efeitos esperados para um agente antitumoral genotóxico foram efetivos nas células tumorais, como sugerem os resultados obtidos, mas com grande prejuízo para as células normais.

A doxorubicina atua indireta ou diretamente na danificação da molécula de DNA. Um efeito indireto é a produção de radicais livres através da reação de oxidação da droga ou a interação da droga com ferro livre no citossol (Akman et al, 1992; Manjanatha et al, 2014). A metabolização da doxorubicina no fígado é acompanhada pela produção de superóxido, que pode desencadear uma série de reações que geram radicais hidroxila altamente tóxicos. (Herman et al, 1998; Mizutani et al, 2003; Todorova et al, 2010), reativos à molécula de DNA. A ação direta da doxorubicina na molécula de DNA decorre da sua característica intercalante nesta molécula. Agentes intercalantes do DNA são um grupo de compostos com estrutura diversa e com habilidade de se ligar firmemente, porém de maneira reversível, ao DNA, por intercalação de um domínio aromático planar do agente entre os pares de bases do DNA. O resultado deste processo é a interferência do agente intercalante com as topoisomerasas I e II, que são enzimas com a propriedade de manter a topologia correta do DNA nas células, mantendo a estrutura desta molécula (Marverti et al, 2008; Salerno et al, 2010). Esta interferência no complexo DNA-topoisomerase durante a replicação ou transcrição do DNA podem induzir eventos letais para a célula, principalmente como consequências quebras na dupla-fita do DNA (Miskovic et al, 2013). Esse tipo de danificação pode ser quantificada nas metodologias empregadas neste estudo, cujo resultado sugerem a ação antitumoral da doxorubicina, bem como a sua provável toxicidade para as células normais.

Tabela 6. Valores de p relativos às comparações das frequências de células micronucleadas obtidas nas diferentes linhagens celulares com o controle *BGMK*, obtidos pelo X^2 , nas diferentes concentrações de doxorubicina (0,1, 0,2, 0,4 $\mu\text{g/mL}$).

Linhagens Celulares	<i>BGMK</i>			
	Concentrações ($\mu\text{g} / \text{mL}$)			
	0,0	0,1	0,2	0,4
<i>MCF 7</i>	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05^*$
<i>NCIH 279</i>	$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0,001^{**}$	$p<0,001^{**}$
<i>HL 60</i>	$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0,001^{**}$	$p<0,001^{**}$

* valores significativos ** valores altamente significativos Nível de significância 0,05

Entretanto, quando comparados os tipos de danificação quantificados no presente estudo, as macrolesões, evidenciadas pela presença de micronúcleos nas células, foram as que diferiram estatisticamente, sendo as linhagens tumorais que as apresentaram maior danificação, comparativamente à linhagem controle, apresentando uma relação linhagem/concentração dependente. Os ID e FDs, apesar de diferirem entre as diferentes dosagens de doxorubicina em cada linhagem, os memos parâmetros foram menores ou iguais àqueles da linhagem controle. Estes dados sugerem que os danos foram de grandeza maior por célula individual do que um aumento de células danificadas, pela observação dos maiores valores encontrados para os IDs comparados àqueles das FDs.

Com relação à presença das macoleções (micronúcleos), as células MCF7 responderam de forma positiva (maior danificação) apenas na concentração de 0,4 µg/ mL de doxorubicina, enquanto as linhagens NCIH279 e HL60 demonstraram maior danificação genômica nas concentrações de 0,2 e 0,4 µg/ mL. Essa resposta diferencial ao efeito da droga, se deve ao fato de que as lesões no DNA não-reparadas e os mecanismos de reparo utilizado pela célula, dependem da origem do tumor (Skorski, 2002). Assim, o tratamento do câncer de mama pela terapia genotóxica da doxorubicina parece não apresentar um grau de eficiência adequado, principalmente em detrimento aos efeitos genotóxicos provocados nas células sadias, como sugerem os resultados apresentados neste estudo.

Conclusão

A doxorubicina apresentou genotoxicidade para as linhagens tumorais e células normais. Logo, os resultados aqui apresentados sugerem cautela quanto ao tratamento terapêutico genotóxico da doxorubicina, tendo em vista as diferentes respostas ao dano genômico apresentadas pelas linhagens tumorais e a maior danificação no DNA observadas na linhagem normal (BGMK).

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos que contribuíram de forma direta e indireta na realização deste trabalho. Agradecemos aos órgãos de fomento como CAPES, FACEPE e CNPq e a Universidade Federal de Pernambuco, seus técnicos e colaboradores.

Referências

Alley, R. B., Blankenship, D. D., Bentley, C. R., Rooney, S. (1987). Till beneath ice stream B: 3. Till deformation: evidence and implications. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* (1978–2012), 92(B9), 8921-8929.

Akman, S. A., Doroshov, J. H., Burke, T. G., Dizdaroglu, M. (1992). DNA base modifications induced in isolated human chromatin by NADH dehydrogenase-catalyzed reduction of doxorubicin. *Biochemistry*, 31(13), 3500-3506.

Baguley, B.C., Ferguson, L.R. Mutagenic properties of topoisomerase- targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1400, p. 213-222, 1998.

Berger, J.M. Structure of DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1400, p. 3-18, 1998.

Campos, F. C., Panis, C., Rossi, T., Victorino, V. J., Cecchini, A. L., Cecchini, R. (2012). Aspects related to oxidative stress-mediated toxicity of doxorubicin during chemotherapy treatment. *Applied Cancer Research*, 32(1), 21-25.

Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., and Moreira, P. I. (2009) Doxorubicin: The good, the bad, and the ugly effect. *Curr. Med. Chem.* 16, 3267–328

Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB. 2007. Molecular and cellular mechanisms of anthracyclin cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 7:114–121.

Datta, S., Parajuli, N., Tymoszek, P., Ottina, E., Parson, W., Sgonc, R. Doppler, W. (2013). Replenishment of the B cell compartment after doxorubicin-induced hematopoietic toxicity is facilitated by STAT1. *Journal of leukocyte biology*, jlb-0113053.

Dhawan, A., Kayani, M. A., Parry, J. M., Parry, E., & Anderson, D. (2003). Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 18(6), 487-490.

Escobar, L., Alfonso, P. A., & Aristizábal, F. A. (2009). Assessing two staining methods for cytotoxicity tests on tumor cell lines. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 49-56.

Gallego R, O., Montesinos Muñoz, J., Gaspar, F. L., Balil, A., Eres Charles, N., Franquesa Grane, R., Anton A, I. (2006). Estudio Fase II: doxorubicina liposomal pegilada y ciclofosfamida en pacientes con cáncer de ovario avanzado platinoresistente. *Oncología*, 29(3), 30-39.

Gewirtz, D. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology*, 57(7), 727-741.

Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB. 2008. Anthracycline cardiotoxicity: From bench to bedside. *J Clin Oncol* 26:3777–3784.

Guerreiro, P. S., Fernandes, A. S., Costa, J. G., Castro, M., Miranda, J. P., Oliveira, N. G. (2013). Differential effects of methoxyamine on doxorubicin cytotoxicity and genotoxicity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 757(2), 140-147.

Herman EH, Ferrans VJ. 1998. Animal models of anthracycline cardiotoxicity: Basic mechanisms and cardioprotective activity. *Prog Pediatr Cardiol* 8:49–58.

Kalyanaraman, B., Joseph, J., Kalivendi, S., Wang, S., Konorev, E., and Kotamraju, S. 2002 Doxorubicin-induced apoptosis implications in cardiotoxicity. *Mol. Cell Biochem.* 234–235, 119–124

Manjanatha, M. G., Bishop, M. E., Pearce, M. G., Kulkarni, R., Lyn-Cook, L. E., Ding, W. (2014). Genotoxicity of doxorubicin in F344 rats by combining the comet assay, flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, and pathway-focused gene expression profiling. *Environmental and molecular mutagenesis*, 55(1), 24-34.

Marverti G, Cusumano M, Ligabue A, Di Pietro ML, Vainiglia PA, Ferrari A, Bergomi M, Moruzzi MS, Frassinetti C. Studies on the anti-proliferative effects of novel DNAintercalating bipyridyl-thiourea-Pt(II) complexes against cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. *J Inorg Biochem* 2008;102:699-712. PMID: 18082268.

Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. 2008. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol* 21:978–989

Minetri, P, Menna, E, Salvatorelli G, Caio, L, Gianni. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev* 56 (2004) 185- 229.

Miskovic K, Bujak Loncar M. B, Glavas-Obravac L. Antinroplastic DNA-binding compounds: Intercalating and minor groove binding drugs. *Arh Hig Rada Toksikol* 2013;64:593-602.

Mizutani, H., Oikawa, S., Hiraku, Y., Murata, M., Kojima, M., & Kawanishi, S. (2003). Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper (II) and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Cancer science*, 94(8), 686-691.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1), 55-63.

Nayak, P. G., Paul, P., Bansal, P., Kutty, N. G., Pai, K. S. R. (2013). Sesamol prevents doxorubicin-induced oxidative damage and toxicity on H9c2 cardiomyoblasts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(7), 1083-1093.

S. Salerno, F. Da Settimo, S. Taliani, F. Simorini, C. La Motta, G. Fornaciari and A.M. Marini. Recent Advances in the Development of Dual Topoisomerase I and II Inhibitors as Anticancer Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17, 4270-4290

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988). A simple technique for the quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175:184-191.

Souza, N. N., Roscani, M. G., Polegato, B. F., Pereira, E. J., Ferreira, A. L., Matsubara, L. S., Matsubara, B. B. (2009). Avaliação ecocardiográfica da cardiotoxicidade aguda induzida por doxorubicina em ratos. *Revista Brasileira de Ecocardiografia e Imagem Cardiovascular*,

22(3), 20-25.

Spencer, D.M.S, Bilard T,H, Koch, C.G, Posta, J.W, Nafie K, L, Kimura et al. (2008). DNA reappear in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Muta. Res.* 638.

Skorski, Tomasz. "BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability." *Oncogene* 21.56 (2002): 8591.

Takemura G, Fujiwara H. 2007. Doxorubicin induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* 49:330–352

Tice, R.R.; Agurrel, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartman, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, T.F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Tesing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.

Todorova AK, Kaufmann Y, Hennings L, Klimberg VS. 2010. Oral glutamine protects against acute doxorubicin-induced cardiotoxicityof tumor-bearing rats. *J Nutr* 140:44–48.

Wang, S., Song, P.,Zou, M. H. (2012). Inhibition of AMP-activated Protein Kinase α (AMPK α) by Doxorubicin Accentuates Genotoxic Stress and Cell Death in Mouse Embryonic Fibroblasts and Cardiomyocytes Role of p53 and Sirt1. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8001-8012.

Wu, X-X., et al. "Doxorubicin enhances Trail-induced apoptosis in prostate cancer." *International journal of oncology* 20.5 (2002): 949-954.

Yurtcu, E., İseri, Ö. D e Sahin, F. I. (2014). Genotoxic and cytotoxic effects of doxorubicin and silymarin on human hepatocellular carcinoma cells. *Human & experimental toxicology*, 0960327114529453.

Danos genômicos diferenciais induzidos pela prodigiosina em diferentes linhagens tumorais

Lapenda, J.C.L.¹, Adam, M.L.², Nascimento, S.C.³

¹ Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Author for correspondence:

¹Jeanne Cristina Lapenda Lins, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife-PE, Brasil. Fone.: 81-2126 8346; Ramal: 207 ou (81) 8859 4299 ou (81) 9873 5029.
E-mail: jeannecantalice@gmail.com

Danos genômicos diferenciais induzidos pela prodigiosina em diferentes linhagens tumorais

Lapenda, J.C.L.¹, Adam, M.L.², Nascimento, S.C.³

¹ Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Resumo

O pigmento vermelho prodigiosina é um alcalóide produzido pela enterobactéria *Serratia marcescens*. Este pigmento pertence a família das prodigininas cuja a estrutura química corresponde a $C_{20}H_{25}N_3O$ e peso molecular de 324. A prodigiosina, metabólito secundário, devido as suas diversas propriedades biológicas tem adquirido importância medicinal, farmacêutica, principalmente, e industrial. São observadas algumas propriedades biológicas para a prodigiosina como antibacteriana, antifúngica, antimalarial, algicida, antitripanossomídeo, antitumoral, induzindo apoptose em linfócitos T e B. Entretanto, por este pigmento ser fortemente sugerido como um antineoplásico faz-se necessários estudos de genotoxicidade. Neste sentido o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos genotóxicos da prodigiosina em linhagens tumorais e normais. As linhagens empregadas neste ensaio foram NCIH-292 (Carcinoma mucoepidermoide de pulmão), MCF-7 (Adenocarcinoma de mama) e HL-60 (Leucemia promielocítica humana). Foi utilizada também neste estudo uma linhagem de células normais a BGMK (Célula normal de rim de macaco). A prodigiosina empregada neste estudo foi previamente produzida, purificada e caracterizada obtendo um peso molecular de 323 e absorvância máxima em 534 nm. Foram observados resultados estatisticamente significativos para a daniificação genômica induzida pela prodigiosina em linhagens tumorais NCIH-279, MCF-7, HL-60 e a linhagem normal BGMK. Foram observados níveis de significância ($p < 0,05$) e valores de p relativos em todas as concentrações testadas quando comparadas com as concentrações controles. Foi observado também que o pigmento induz formação de micronúcleo em células tumorais. A prodigiosina apresentou daniificação genômica em linhagens tumorais. Este dados corroboram com o potencial de ação antitumoral da prodigiosina. Entretanto, demonstra também a preocupação com seu alvo-específico de ação, pois foram evidenciados também efeitos genotóxicos para células normais. Logo, sugerindo estudos futuros que elucidem melhor possíveis alvos de ação da prodigiosina visando potencializar a ação antineoplásica deste droga e a sua aplicação nas terapias antitumorais.

Palavras-chaves: *Serratia marcescens*, Prodigiosina, Genotoxicidade, Micronúcleo, Células tumorais.

Introdução

Atualmente, terapias anticâncer têm sido baseadas, principalmente, na imposição de danos no DNA às células tumorais, na diminuição de sua capacidade de reconhecimento e reparo desses danos. Muitos compostos químicos com propriedades genotóxicas têm sido utilizados na terapia contra o câncer, muitos dos quais sem os mecanismos que levam à danificação do DNA, sua forma de detecção e reparo e a morte celular induzida por danos no DNA terem sido elucidados com precisão. Esta aplicação precoce de drogas sem uma avaliação adequada pode resultar na modificação da resposta à terapia, comprometendo a sobrevivência pós-terapêuticos pacientes, causando toxicidade aguda ou crônica, bem como o risco de desenvolvimento de resistência aos fármacos antitumorais (Petkova et al, 2013). Entretanto, essas drogas sintéticas são muitas vezes a única opção para a quimioterapia, mesmo quando seus efeitos atingem não só as células tumorais, mas também as normais, além dos graves efeitos colaterais associados à esse tipo de terapia (Chang et al, 2011). Neste sentido, esforços tem sido despendidos nas pesquisas de compostos derivados de produtos naturais, que sejam menos tóxicos e não menos eficazes que os produtos sintéticos para a terapia do câncer (Ravelo et al, 2004; Cragg et al, 2009; Ma e Wang, 2009). Nas últimas décadas, pesquisas em grande escala tem utilizado microrganismos, plantas, animais e organismos marinhos na busca dessas drogas antitumorais (Cragg et al, 2009). Entre tais estudos, aqueles realizados com microrganismos têm se destacado (Chang et al, 2011).

O pigmento vermelho natural, prodigiosina, sintetizado pela enterobactéria *Serratia marcescens*, é caracterizado quimicamente como um alcalóide que apresenta uma estrutura química planar tripirrol linear (pirrol, 3-metoxipirrol, 2-metil-3-amilpirrol), denominada prodigioseno (Guryanov et al., 2012). A prodigiosina tem se destacado entre os produtos naturais de microrganismos pela sua atividade antitumoral (Abrahantes et al., 2013; Shanks et al., 2013).

A estrutura planar da molécula de prodigiosina caracteriza-a como um agente intercalante na molécula de DNA. Agentes intercalantes podem levar a alterações estruturais no DNA e atuam, principalmente, como inibidores das topoisomerasas I e II. Esse efeito inibitório pode ocasionar danos no DNA que estão diretamente correlacionados com níveis de citotoxicidade. A interação da prodigiosina com o DNA podem, portanto, resultar em efeitos de danificação genômicas, caracterizando-a como um potencial agente tumoral com seletividade para as células tumorais (Montaner et al., 2000; Salerno et al, 2010; Chang et al, 2011; Miskovic et al, 2013; Fineran et al., 2013).

Este estudo objetivou evidenciar possíveis danificações genômicas quantitativamente diferenciais em células tumorais expostas a diferentes concentrações de prodigiosina em relação às células normais, visando contribuir para a elucidação dos efeitos antitumorais e seletivos deste produto natural.

Material e Método

Células e condições de cultura

Foram empregadas neste estudo as seguintes linhagens tumorais: NCIH-292 (Carcinoma mucoepidermoide de pulmão), MCF-7 (Adenocarcinoma de mama) e HL-60 (Leucemia promielocítica humana). Foi utilizada também neste estudo uma linhagem de células normais a BGMK (Célula normal de rim de macaco). Todas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Culturas de Células e Ensaio farmacológicos, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. As linhagens foram cultivadas (2×10^5 células/ mL) em frascos (25 cm^2 / 60 mL) para cultura de tecidos contendo o meio Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (DMEN, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI / mL

+ estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM e incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Purificação e caracterização da prodigiosina

A prodigiosina foi previamente purificada e caracteriza por espectrofotometria UV-vis e espectrofotometria de massa GCMS conforme descrito por Nakashima et al., 2006 e 2008).

Ensaio de genotoxicidade da prodigiosina em linhagens tumorais

O efeito genotóxico da prodigiosina foi avaliado pelos Ensaios Cometa e Micronúcleo, segundo o método descrito por Morris e colaboradores (2002) e Tice e colaboradores (2000) com modificações, e Fenech e colaboradores (1993), respectivamente.

Tratamento das culturas celulares e período de exposição

Cerca de 2×10^5 células por mL das linhagens NCIH- 292, MCF-7, HL-60 e a linhagem normal BGMK foram cultivadas em microplacas de 24 poços em meio acima especificado (1 mL/ poço), e incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ , durante 24 horas.

Após o período de incubação, foram adicionadas as soluções de prodigiosina nas concentrações de 1,7; 3,4 e 6,8 µg/ mL, para cada tratamento independente realtivo a cada linhagem celular. As concentrações de prodigiosina empregadas para análises foram calculadas com base na determinação prévia da IC₅₀ (Lapenda, 2014), onde foram testadas a dose reduzida a metade (1,7 µg/ mL) e duplicada (6,8 µg/ mL). Após este período, o meio foi aspirado e as

células foram lavadas com 300 µL de solução tampão (PBS, pH 7,2) e, em seguida, tratadas com 300 µL de tripsina/ EDTA. Posteriormente, para inativação da tripsina, foi adicionado 600 µL de meio DEMEN e em seguida, as amostras foram aspiradas e transferidas para tubos de Eppendorf para o posterior processamento.

Para o processamento das amostras, inicialmente, as mesmas foram lavadas com 60 µL de solução tampão (PBS, pH igual a 7,2) e centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, o meio de cultura foi desprezado e as células foram ressuspensas com 60 µL de PBS, estando a solução celular adequada para o sua aplicação nos testes genotóxicos.

Teste de micronúcleo (Micronuclei assay)

Duas gotas da suspensão celular foram transferidas para lâminas previamente lavadas e ainda molhadas, realizando um esfregão, sendo mantidas na posição horizontal até a sua secagem na temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto (P.A) por 5 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente e submetidas à coloração com a utilização do corante Giemsa (Merck), o qual foi depositado de forma uniforme sobre as lâminas, por um tempo médio de 5 minutos, sendo, posteriormente, novamente lavadas com água corrente e secas à temperatura ambiente.

Ensaio cometa (Comet assay)

Cerca de 15 µL da suspensão celular foi homogeneizada em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LM) previamente aquecida em banho maria a 37 °C. Em seguida, o homogeneizado foi transferido para lâminas de vidros revestidas de agarose padrão, cobertas com lamínulas e incubadas por 10 minutos sob refrigeração a 4 °C. Após este período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise por 2 horas sob

refrigeração a 4°C. Transcorridas as duas horas, as lâminas foram submetidas a eletroforese (40 V por 20 minutos e a 300 mA). Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de neutralização por 15 minutos e, posteriormente, fixadas em solução de etanol absoluto por 5 minutos. Em seguida, após a secagem, foram armazenadas em geladeira até o momento da coloração. Para coloração foi empregado o corante Gel Red (Biotarget GelRed®), onde 1 µL de corante foi homogeneizado em 1000 µL de água deionizada estéril (1 : 1000). As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus -Série BX) e em seguida, foram realizadas as contagens celulares onde cerca de 100 células por indivíduos tratados foram analisados, sendo atribuídos escores de 0 – 4, conforme o nível de dano no nucleóide.

Testes estatísticos

Comparações entre os Índices de Danos, Frequências de Danos e Frequências de Células Micronucleadas foram realizadas através do teste Qui-Quadrado (X^2), individualmente por tratamento/linhagem tumoral e dos mesmos em relação à linhagem normal BGMK. O nível de significância adotado para os testes foi 0,05.

Os Índices de Proporcionalidade (IP) de danos foi estabelecido em cada tratamento em relação ao seu próprio controle (0,0 µg/ mL de prodigiosina), como também em relação às concentrações coincidentes da linhagem BGMK, para todos os parâmetros metodológicos utilizados.

Resultados

Praticamente, todas as linhagens celulares (tumoraes e normal) apresentaram diferenças significativas de danificação genômica avaliada pelos parâmetros de Índice de Danos (ID) e Frequência de Danos (FD), obtidos pelo Ensaio Cometa, em relação ao seu próprio controle

(Tabela 1). As exceções corresponderam às linhagens tumorais NCIH 279 e MCF 7, na concentração de 1,7 µg/ mL de prodigiosina, sendo referentes à ID/FD e FD, respectivamente.

Na comparação estabelecida para o ID entre os tratamentos e a linhagem controle, uma diferença estatisticamente significativa foi observada apenas para a linhagem MCF 7, na concentração de 6,8 µg/ mL de prodigiosina (Tabela 2). Quando o parâmetro considerado foi a FD, nenhuma das linhagens tumorais diferiu estatisticamente da linhagem controle em todas as concentrações de prodigiosina avaliadas (Tabela 3).

Tabela 1. Índice e frequência de danificação genômica observadas em linhagens tumorais e normais (BGMK), após exposição em 48 horas a diferentes concentrações de prodigiosina (1,7; 3,4 e 6,8 µg / mL), e os valores de *p* relativos às comparações com os respectivos controles de cada linhagem, obtidos pelo χ^2

µg / mL	Linhagens celulares															
	HL 60				NCIH 279				MCF 7				BGMK			
	ID	<i>p</i>	FD	<i>p</i>	ID	<i>p</i>	FD	<i>p</i>	ID	<i>p</i>	FD	<i>p</i>	ID	<i>p</i>	FD	<i>p</i>
0,0	8		7		12		10		9		8		8		6	
1,7	25	<0,001	18	<0,001	14	>0,05	11	>0,05	17	<0,001	13	>0,05	22	<0,001	18	<0,001
3,4	34	<0,001	23	<0,001	28	<0,001	19	<0,001	27	<0,001	20	<0,001	37	<0,001	27	<0,001
6,8	54	<0,001	34	<0,001	55	<0,001	31	<0,001	39	<0,001	26	<0,001	60	<0,001	40	<0,001

ID (Índice de dano genômico); FD%: Frequência de dano genômico; Nível de significância 0,05

Tabela 2. Índices de danificação genômica observados em linhagens tumorais e normais (BGMK), após exposição em 48 horas a diferentes concentrações de prodigiosina (1,7; 3,4 e 6,8 µg / mL), os índices de proporcionalidade de danos e os valores de *p* relativos às comparações com o controle (BGMK), obtidos pelo χ^2

µg / mL	Linhagens celulares									
	HL 60			NCIH 279			MCF 7			BGMK
	ID	IP	<i>p</i>	ID	IP	<i>p</i>	ID	IP	<i>p</i>	ID
0,0	8	1,0	>0,05	12	1,5	>0,05	9	1,1	>0,05	8
1,7	25	1,1	>0,05	14	1,5	0,1> <i>p</i> >0,05	17	1,3	0,1> <i>p</i> >0,05	22
3,4	34	1,1	>0,05	28	1,3	0,1> <i>p</i> >0,05	27	1,4	0,1> <i>p</i> >0,05	37
6,8	54	1,1	>0,05	55	1,1	>0,05	39	1,5	<i>p</i> <0,01*	60

ID (Índice da dano genômico); IP (Índice de Proporcionalidade de Danos; Nível de significância 0,05; * valor significativo

Tabela 3. Frequências de danificação genômica observadas em linhagens tumorais e normais (BGMK), após exposição em 48 horas a diferentes concentrações de prodigiosina (1,7; 3,4 e 6,8 µg / mL), os índices de proporcionalidade de danos e os valores de p relativos às comparações com o controle (BGMK), obtidos pelo X^2

µg / mL	Linhagens celulares									
	HL 60			NCIH 279			MCF 7			BGMK
	FD	IP	p	FD	IP	p	FD	IP	p	FD
0,0	7	1,2	>0,05	10	1,6	0,1> p >0,05	8	1,3	>0,05	6
1,7	18	1,0	>0,05	11	1,6	>0,05	13	1,4	0,1> p >0,05	18
3,4	23	1,2	>0,05	19	1,4	0,1> p >0,05	20	1,3	>0,05	27
6,8	34	1,2	>0,05	31	1,3	>0,05	26	1,5	0,1> p >0,05	40

ID (Frequência de dano genômico); IP (Índice de Proporcionalidade de Danos; Nível de significância 0,05

Nas tabelas 2 e 3 podem ser observados os Índices de Proporcionalidade (IP) de danos para cada linhagem em relação ao controle, tanto para ID quanto para FD. Todas as linhagens tumorais apresentaram uma proporção menor de danos em relação à BGMK para ambos os parâmetros em todas as concentrações de prodigiosina, A única exceção observada foi em relação à HL60 na concentração 1,7 µg/ mL, tanto para o ID quanto o FD.

O número de células micronucleadas e suas respectivas frequências obtidas por linhagem/tratamento estão demonstrados na tabela 4. Diferenças estatisticamente significativas de células micronucleadas foram obtidas para MCF7 (6,8 µg/ mL de prodigiosina), NCIH279 (3,4 µg/ mL) e HL60 (3,4 e 6,8 µg/ mL) (tabela 5).

Quando comparados os. Índices de Proporcionalidade de Danos entre a concentração de

prodigiosina controle (0,0µg/mL) e os diferentes tratamentos, e entre os tratamentos, referentes aos três parâmetros metodológicos empregados (tabela 6), os maiores índices podem ser observados com relação ao parâmetro células micronucleadas.

Tabela 4. Evidências de micronúcleos observados em linhagens tumorais e normais (BGMK), após exposição em 48 horas a diferentes concentrações de prodigiosina (1,7; 3,4 e 6,8 µg / mL).

µg / mL	Linhagens celulares							
	<i>BGMK</i>		<i>MCF 7</i>		<i>NCIH 279</i>		<i>HL 60</i>	
	CM	FMN	CM	FMN	CM	FMN	CM	FMN
0,0	4	0,0040	6	0,0060	4	0,0040	6	0,0060
1,7	12	0,0120	8	0,0120	17	0,0170	16	0,0160
3,4	21	0,0210	18	0,0210	29	0,0290	30	0,0300
6,8	38	0,0380	27	0,0380	40	0,0400	48	0,0480

CMN (Células micronucleadas) FMN (Frequência de micronúcleos)

Tabela 5. Valores de *p* relativos às comparações das frequências de células micronucleadas obtidas nas diferentes linhagens celulares com o controle *BGMK*, obtidos pelo χ^2

Linhagens Celulares	<i>BGMK</i>			
	Concentrações (µg / mL)			
	0,0	1,7	3,4	6,8
<i>MCF 7</i>	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> <0,05*
<i>NCIH 279</i>	<i>p</i> >0,05	0,1> <i>p</i> >0,05	<i>p</i> <0,05*	<i>p</i> >0,05
<i>HL 60</i>	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> <0,05*	<i>p</i> <0,001**

* valores significativos

** valores altamente significativos

Nível de significância 0,05

Tabela 6. Índices de proporcionalidade entre a concentração ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de prodigiosina controle e os diferentes tratamentos, e entre os tratamentos, referentes aos parâmetros metodológicos Índice de Danos, Frequência de Danos e Número de Células Micronucleadas.

$\mu\text{g} / \text{mL}$	Parâmetros metodológicos														
	Índice de Danos					Frequência de Danos					Células Micronucleadas				
	IPT					IPT					IPT				
	IPc					IPc					IPc				
	ID	8	22	37	60	FD	6	18	27	40	MN	4	12	21	38
0,0	8	-	-	-	-	6	-	-	-	-	4	-	-	-	-
1,7	22	2,7	-	1,7	2,7	18	3,0	-	0,4	2,2	12	3,0	-	1,7	3,2
3,4	37	4,6	1,7	-	1,6	27	4,5	0,4	-	1,5	21	5,2	1,7	-	1,8
6,8	60	7,5	2,7	1,6	-	40	6,7	2,2	2,2	-	38	9,5	3,2	1,8	-

IPc – Índice de Proporcionalidade em relação ao controle ($0,0\mu\text{g} / \text{mL}$)

IPT - Índice de Proporcionalidade entre os tratamentos

MN – Número de Células Micronucleadas

Discussão

A citotoxicidade seletiva contra as células cancerosas, o efeito pro-apoptótico p53-independente e a sua atividade anti-metastática colocam a prodigiosina entre os metabólitos com grande potencial como um agente anticâncer (Chang et al, 2011). Entretanto, maiores esclarecimentos acerca do alvo molecular/celular e os efeitos, tanto no nível celular quanto do organismo, deste composto são necessários para o emprego deste metabólico como um produto terapêutico com eficiência e seletividade asseguradas. Neste sentido, os resultados apresentados no presente estudo vêm contribuir para o melhor emprego deste potencial agente antitumoral.

As análises realizadas, em relação à quantificação da danificação genômica induzida pela prodigiosina, nas diferentes linhagens tumorais, apresentaram diferenças significativas em relação à exposição das mesmas às diferentes concentrações da droga. Todas as linhagens, com exceção das linhagens NCIH para os ID e FD na concentração 1,7 e MCF para o FD na mesma concentração, apresentaram maiores efeitos de danificação genômica/concentração dependente, onde os maiores efeitos foram observados nos tratamentos com $6,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ de prodigiosina de cada linhagem. Tais efeitos foram similares nas duas metodologias empregadas. Entretanto,

respostas diferenciais foram observadas em alguns tratamentos, sendo específicas para cada linhagem, quando comparadas com o controle BGMK, tanto pelo Ensaio Cometa quanto pelo Teste de Micronúcleo. Lesões no DNA e o seu mecanismo de reparo podem depender da origem do tumor (Skorski, 2002). Desta maneira, serão consideradas abaixo cada linhagem celular independentemente.

HL60.

Em relação à comparação do Índice de Danificação (ID) observado pelos diferentes níveis de danos nos nucleóides, analisados pelo Ensaio Cometa, a linhagem tumoral HL60, apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas em relação à danificação ocorrida na linhagem controle (BGMK), nas concentrações 3,4 e 6,8 µg/mL foi observada cerca de 10% de danificação genômica maior nas células normais (BGMK), como indica o Índice de Proporcionalidade de danos (IP=1,1). Quanto à Frequência de Danos (FD), a linhagem HL60 mostrou uma frequência menor (IP=1,2) de danos nas concentrações 3,4 e 6,8 µg/mL em relação à BGMK.

Os menores valores de FD observados em HL60, em relação àqueles de BGMK, sugerem uma relação com o efeito de resistência ao tratamento genotóxico desencadeado naquelas células. A tirosina-quinase oncogênica BCR/ABL apresenta dois papéis principais complementares no câncer (Skorski, 2002). Primeiramente, BCR/ABL permite a proliferação celular na ausência de fatores de crescimento, a proteção contra a apoptose na ausência de fatores de sobrevivência externos, a invasão tecidual e a metástase (Sawyers, 1997). A segunda característica de BCR/ABL, em doenças hematológicas malignas, se refere à sua capacidade de tornar as células resistentes às terapias genotóxicas (Amarante-Mendes et al, 1998; Bedi et al, 1995; Dubrez et al, 1998; Nishii et al, 1996; Slupianek et al, 2001; Skorski, 2002). Esta

característica se deve a: 1) células BCR/ABL positivas poderem reparar os danos no DNA mais rapidamente; 2) podem ativar prontamente os pontos de checagem do ciclo celular danos no DNA-dependentes, permitindo mais tempo para o reparo do DNA; e 3) podem ativar mecanismos de proteção celular contra as vias de sinalização pró-apoptóticas que são normalmente ativadas pelas lesões no DNA. Skorski (2002), Majsterek e colaboradores (2002) e Slupianek e colaboradores (2002), utilizando a metodologia do Ensaio Cometa, observaram que a danificação genômica foi reparada mais eficientemente em células BCR/ABL positivas em comparação a células controle. Assim, a menor frequência de danificação genômica, observada pelo Ensaio Cometa, nas concentrações 3,4 e 6,8 µg/ mL de prodigiosina na linhagem hematológica, em relação à BGMK, sugere a ação de BCR/ABL como descrita acima.

Apesar da FD ter se apresentado menor em relação ao controle em HL60, o ID foi indicativo de uma danificação de maior magnitude, ou seja, maiores danos por células, o que poderia contribuir para a ação efetiva desta droga.

Essa efetividade pode ser considerada também pela observação das maiores frequências de células micronucleadas em HL60. Quando avaliados os danos no seu nível de macro-danificação, pela expressão de micronúcleos, a linhagem HL60 apresentou resultados significativos ($p < 0,001$) em relação à BGMK, para as concentrações 3,4 e 6,8 µg/ mL, onde a frequência de micronúcleos apresentou IPs de 1,4 e 1,7, respectivamente. Mas, como explicar a maior incidência de células micronucleadas comparativa ao controle e os maiores IDs em HL60, em contradição com a suposta indução de resistência à terapia genotóxica? Segundo Skorski (2002), células normais apresentam mecanismos de reparo do DNA fortemente regulados e associados às vias apoptóticas. Células com um excesso de danos e/ou com danos irreparáveis, que representam uma ameaça à estabilidade genômica, são eliminadas. Entretanto, células BCR/ABL positivas, como as leucêmicas, apesar de serem mais eficientes na sobrevivência ao dano genotóxico, modulando a sensibilidade ao dano por facilitar o reparo do

DNA e inibir a indução da apoptose induzida pelas lesões no DNA, podem acumular mais danos no DNA depois de um tratamento genotóxico (Slupianek et al, 2002), aumentando sua chance de erros genéticos prejudiciais. Uma vez que a fidelidade e a eficiência dos mecanismos de reparo do DNA não são completas, mesmo em células normais, em células BCR/ABL positivas a probabilidade de acumular erros no DNA é maior que em células normais devido à maior ocorrência de danos e o comprometimento dos mecanismos de reparo do DNA (Skorski, 2002). A maior danificação genômica nestas células se deve, provavelmente, ao aumento da formação de substâncias-oxigênio-reativas (ROS) provenientes da mitocôndria e NADPH oxidase, induzida por BCR/ABL (Benhar et al, 2001; Sattler et al, 2000). Neste contexto, a prodigiosina aplicada, principalmente, nas concentrações 3,4 e 6,8 µg/mL no presente estudo, visando uma ação tumoral efetiva relativa à Leucemia Promielocítica (HL60), podem ocasionar uma maior danificação genômica de células tumorais, principalmente em relação ao nível de dano causado (ID) das mesmas, como sugerem os resultados acima apresentados.

NCIH 279

A danificação genômica apresentada pela linhagem NCIH 279 apresentou-se menor em relação ao controle quanto à FD em todas as concentrações de prodigiosina avaliadas, apesar de diferenças estatisticamente não significativas terem sido observadas tanto para ID quanto a FD em todas as concentrações. Na análise de micronúcleos, NCIH 279 apresentou uma maior frequência de micronúcleos na concentração 3,4 µg/mL quando comparada à mesma concentração da prodigiosina aplicada à BGMK. A não significância estatística em relação à maior concentração (6,8µg/mL), provavelmente, seja devida ao aumento considerável de micronúcleos na linhagem normal na presença da droga. A ação da prodigiosina em células tumorais pulmonares, segundo os resultados obtidos, aponta para um efeito de maior de

danificação por célula neste tumor, do que um aumento de células danificadas, sendo necessária a aplicação de altas concentrações da droga, e desta maneira, podendo comprometer as células normais, como mostra a frequência de células micronucleadas da linhagem normal na concentração 6,8µg/mL.

A capacidade de reparar danos no DNA em células normais diminui o seu risco de transformação maligna. Entretanto, células malignizadas podem reparar danos no DNA induzidos por terapias genotóxicas, tornando-as menos sensíveis às mesmas (Petkova et al, 2013). Cerca de 25 genes de reparo do dano genotóxico tem sido descritos, como também os seus fatores de transcrição (Christmann e Kaina, 2013). Alterações em ambos grupos de genes podem levar ao aumento da instabilidade genômica tumoral ou, contrariamente, levar à resistência à terapia genotóxica (Skorski. 2002; Willer et al, 2013; Gachechiladze et al, 2013; Shin et al, 2014). Existem muitas evidências de que perturbações nas vias de reparo do DNA são comuns no câncer de pulmão, alterando a resistência das células afetadas para muitos quimioterápicos (Willer et al, 2013). Entre estes genes prováveis, atuantes na resistência à danificação genômica por quimioterápicos, no câncer de pulmão se encontra o gene *brca1*, devido às suas funções no reparo do DNA, incluindo o reparo por excisão de nucleotídeos e de quebra na dupla fita de DNA (Gachechiladze et al, 2013). Tendo em vista o exposto acima, as diferentes frequências de danificação (FD) observadas na linhagem NCIH 279, observadas no presente estudo, em menores valores nas células tumorais, sugerem a ação de genes de resistência ao danos genotóxicos. E, da mesma maneira, a explicação sugerida para as maiores frequências de células micronucleadas apresentadas pelas células leucêmicas, pode ser aplicada neste caso.

A linhagem MCF 7, interessante, apresentou valores de ID e FD menores que a linhagem controle em todas as concentrações, com uma significância estatística apresentada na concentração 6,8µg/mL, tanto para o ID quanto para a frequência de micronúcleos, com IPs variando entre 1,1 – 1,5 e 1,2 -1,5, respectivamente. Com relação aos menores valores de ID e FD observados em MCF 7, tais resultados apontam para a principal causa de falha no tratamento quimioterápico deste câncer, a resistência multidroga (Tao et al, 2013; Luzhna et al, 2013).

Geralmente, os mecanismos de resistência a agentes terapêuticos não são consequências diretas da malignização celular, mas pode ser o resultado da seleção de clones de células tumorais que desenvolvem mecanismos de proteção, diminuindo a incidência de danos no DNA pelo aumento do metabolismo e/ou efluxo da droga (Harrison, 1995; el-Deiry, 1997; Pegram et al, 1997). Entre estas possibilidades se encontra a glicoproteína-P, produto do gene de resistência multidroga 1 (MDR1). Esta glicoproteína é uma bomba de efluxo ATP-dependente associada com a menor eficiência da quimioterapia no câncer de mama (Tao et al, 2013). Portanto, apesar da prodigiosina ser um potente agente causador de danos no DNA, pela sua característica molecular referente à sua estrutura planar, possibilitando a sua intercalação na molécula de DNA, os mecanismos de efluxo da droga, nas células tumorais mamárias, podem ter contribuído para a menor eficiência desta droga, como demonstrado pelos IDs e FDs obtidos neste estudo.

Entretanto, a prodigiosina foi capaz de induzir danos significativos na concentração 6,8µg/mL, quando consideradas as macro-lesões, observadas pela maior incidência de células micronucleadas nesta linhagem celular, em comparação à BGMK. Células tumorais mamárias (MCF 7) podem apresentar desregulação em vias biológicas, tais como, ciclo celular, replicação do DNA, reparo do DNA e ativação da via *p53* (Luzhna et al, 2013), que envolvem alterações em genes específicos (Eisenberg e Koifman, 2001; Rosen et al, 2005; Carvalho et al,

2011; Cesar et al, 2012; Guerreiro et al, 2013). Essa desregulação pode levar ao estabelecimento de instabilidade genômica inducida por agentes genotóxicos (Skorski, 2002).

Portanto, apesar das células MCF 7 apresentarem a resistência ao tratamento quimioterápico, a aplicação da prodigiosina na concentração 6,8µg/mL pode causar danos genômicos maiores nestas células tumorais, danos esses não sendo passíveis de reparação pela célula, como demonstrado neste estudo, pela maior frequência de células MCF 7 micronucleadas em comparação à BGMK. Desta maneira, o propósito da terapia antitumoral através da prodigiosina pode ser atingido nesta concentração, visando uma maior danificação genômica das células tumorais para fins de ativação da apoptose-dano genômico- induzida.

BGMK

Os resultados apresentados no presente estudo alertam para os efeitos observados na linhagem normal BGMK, e questionam a real seletividade da prodigiosina. Em todos os parâmetros avaliados (ID, FD e micronúcleos) as células BGMK apresentaram consideráveis efeitos genotóxicos em todas as concentrações de prodigiosina em relação ao seu controle, como demonstram aos índices de proporcionalidade (IP). Os mesmos variaram entre 2,75 – 7,5 para o ID, 3,0 – 6,66 para a FD e 3,0 – 9,5 para a frequência de células micronucleadas. Entre os tratamentos os IPs também tiveram valores maiores dose dependentes. Em alguns tratamentos, como discutido acima, as células normais apresentaram maior danificação genômica em relação às linhagens tumorais. Esses resultados sugerem que a prodigiosina também atua, e de maneira preocupante, nas células normais, colocando em risco o organismo como um todo.

Terapias antitumorais com agentes genotóxicos tem sido associadas com o risco de toxicidade. Os tratamentos genotóxicos, de modo geral, são direcionados rapidamente para as células que estão ativas no ciclo celular, como a maioria das células cancerosas. Entretanto, o agente genotóxico pode afetar, mesmo em menor grau, todas as células capazes de se dividir (Petkova et al, 2013).

A principal preocupação com relação à terapia genotóxica é a qualidade de vida do paciente antes e depois da terapia. Esta pode ser severamente afetada durante e depois do tratamento com os agentes genotóxicos, onde alguns pacientes podem adoecer consideravelmente, resultando na suspensão da terapia, e, em outros casos, eles podem morrer em decorrência da severa inibição do crescimento e funções das células normais (Petkova et al, 2013).

As maiores frequências e índices de danificação, bem como as frequências de células micronucleadas, observadas na linhagem BGMK, apontam para os efeitos danosos da prodigiosina em células normais, uma vez que a sua seletividade para as células tumorais não pode ser comprovada neste estudo.

Outro provável mecanismo de ação da prodigiosina que pode ter contribuído para os efeitos observados em todas as linhagens tumorais avaliadas neste estudo, é a reativação de *p53*. Hong e colaboradores (2013) observaram que a prodigiosina pode reativar a atividade transcricional dependente da família *p53* em células tumorais do cólon. Segundo os mesmos pesquisadores, o mecanismo de ação da prodigiosina realizou-se através da restauração da sinalização *p53* em células tumorais com mutações *p53 hotspot*, com pouca ou nenhuma toxicidade/genotoxicidade detectáveis em fibroblastos humanos normais. A prodigiosina induziu a expressão de *p73* e interrompeu a sua interação com a proteína *p53* mutante, salvando

assim a deficiência via *p53*, promovendo os efeitos anti-tumorais . O rompimento da interação *p53/p73* mutante foi específico para prodigiosina.

A controversa ação seletiva da prodigiosina para o tratamento do câncer, apresentada neste estudo, sugere a realização novas pesquisas para o esclarecimentos das vias de ação desta droga, assegurando a sua aplicação na terapia antitumoral genotóxica.

Conclusões

A prodigiosina apresentou danificação genômica em linhagens tumorais. Este dados corroboram com o potencial de ação antitumoral da prodigiosina. Entretanto, demonstra também a preocupação com seu alvo-específico de ação, pois foram evidenciados também efeitos genotóxicos para células normais. Logo, sugerindo estudos futuros que elucidem melhor possíveis alvos de ação da prodigiosina visando potencializar a ação antineoplásica deste droga e a sua aplicação nas terapias antitumorais.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos que contribuíram d forma direta e indireta na realização deste trabalho. Agradecemos aos órgãos de fomento como CAPES, FACEPE e CNPq e a Universidade Federal de Pernambuco, seus técnicos e colaboradores.

Referências

Abrahantes-Pérez, M. C., Reyes-González, J., Ríos, G. V., Bequet-Romero, M., Riera, R. G., Gasmury, C. A., Martínez, E. (2013). Cytotoxic proteins combined with prodigiosin obtained from *Serratia marcescens* have both broad and selective cytotoxic activity on tumor cells.

Amarante-Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR and Bhalla K. (1998b). *Blood*, 91, 1700 $\pm$ 1705.

Bedi A, Barber JP, Bedi GC, el-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS, Akhtar AJ, Hilton J and Jones RJ. (1995). *Blood*, 86, 1148 $\pm$ 1158.

Benhar M, Dalyot I, Engelberg D and Levitzki A. (2001). *Mol. Cell. Biol.*, 21, 6913 $\pm$ 6926.

Carvalho, Filomena M., et al. "Mammagene®: ensaio quantitativo de 21 genes para prognóstico do câncer de mama receptor de estrogênio positivo." *editoria técnica* 20.4 (2011): 164-169.

Cesar, P. G. C., Fonseca, F. L. A., de Sousa Gehrke, F., Alves, B. D. C. A., Kelly, R., Kuniyoshi, A. D. G. (2012). Utilização de plataforma gênica no prognóstico do câncer de mama. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, 37(3), 154-161.

Chang, C. C., Chen, W. C., Ho, T. F., Wu, H. S., & Wei, Y. H. (2011). Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(5), 501-511.

Cragg, G. M., Grothaus, P. G., and Newman, D. J.: Impact of natural products on developing new anti-cancer agents, *Chem. Rev.*, 109, 3012–3043 (2009).

Christmann, M., & Kaina, B. (2013). Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic acids research*, 41(18), 8403-8420.

Dubrez L, Eymin B, Sordet O, Droin N, Turhan AG and Solary E. (1998). *Blood*, 91, 2415 $\pm$ 2422.

Eisenberg, Ana Lucia Amaral, and Sérgio Koifman. "Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura)." *Rev Bras Cancerol* 47.4 (2001): 377-88.

El-Deiry WS. (1997). *Curr. Opin. Oncol.*, 9, 79 $\pm$ 87.

Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 285(1), 35-44.

Fineran, P. C., Cans, M. C. I., Ramsay, J. P., Wilf, N. M., Cossyleon, D., McNeil, M. B., Salmond, G. P. (2013). Draft genome sequence of *Serratia* sp. strain ATCC 39006, a model bacterium for analysis of the biosynthesis and regulation of prodigiosin, a carbapenem, and gas vesicles. *Genome announcements*, 1(6), 01039-13.

Gachechiladze, M., Uberall, I., Kolek, V., Klein, J., Krejci, V., Stastna, J., Skarda, J. (2013). Correlation between BRCA1 expression and clinicopathological factors including brain metastases in patients with non-small-cell lung cancer. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 157(3).

Guerreiro, P. S., Fernandes, A. S., Costa, J. G., Castro, M., Miranda, J. P., & Oliveira, N. G. (2013). Differential effects of methoxyamine on doxorubicin cytotoxicity and genotoxicity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 757(2), 140-147.

Guryanov, I. D., Karamova, N. S., Yusupova, D. V., Gnezdilov, O. I., Koshkarova, L. A. (2013). Bacterial pigment prodigiosin and its genotoxic effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39(1), 106-111.

Harrison DJ. (1995). *J. Pathol.*, 175, 7 ± 12.

Hong, Bo, et al. "Prodigiosin rescues deficient p53 signaling and anti-tumor effects via up-regulating p73 and disrupting its interaction with mutant p53." *Cancer research* (2013): canres-0955.

Luzhna, L., Golubov, A., Ilnytsky, S., Chekhun, V. F., & Kovalchuk, O. (2013). Molecular mechanisms of radiation resistance in doxorubicin-resistant breast adenocarcinoma cells. *International journal of oncology*, 42(5), 1692-1708.

Ma, X. and Wang, Z.: Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective, *Drug Discov. Today*, 14, 1136–1142 (2009).

Majsterek I, Blasiak J, Mlynarski W, Hoser G and Skorski T. (2002). *Cell Biol. Internatl.*, 26, 363 ± 370.

Mišković, K., Bujak, M., Baus Lončar, M., & Glavaš-Obrovac, L. (2013). Antineoplastic DNA-Binding Compounds: Intercalating and Minor Groove Binding Drugs. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 64(4), 593-601.

Morris, I. D., Ilott, S., Dixon, L., Brison, D. R. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 17(4), 990-998.

Nakashima, T., Miyazaki, Y., Matsuyama, Y., Muraoka, W., Yamaguchi, K., Oda, T. (2006). Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium γ -proteobacterium. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(3), 684-690.

Nakashima, T., Iwashita, T., Fujita, T., Sato, E., Niwano, Y., Kohno, M., Oda, T. (2008). A prodigiosin analogue inactivates NADPH oxidase in macrophage cells by inhibiting assembly of p47phox and Rac. *Journal of biochemistry*, 143(1), 107-115.

Nishii K, Kabarowski JH, Gibbons DL, Grifths SD, Titley I, Wiedemann LM and Greaves MF. (1996). *Oncogene*, 13, 2225 ± 2234.

Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ and Slamon DJ. (1997). *Oncogene*, 15, 537 ± 547.

Petkova, R., Chelenkova, P., Georgieva, E., & Chakarov, S. (2013). What's Your Poison? Impact of Individual Repair Capacity on the Outcomes of Genotoxic Therapies in Cancer. Part

I—Role of Individual Repair Capacity in the Constitution of Risk for Late-Onset Multifactorial Disease. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(6), 4208-4216.

Ravelo, A. G., Estévez-Braun, A., Chávez-Orellana, H., Pérez-Sacau, E., and Mesa-Siverio, D.: Recent studies on natural products as anticancer agents, *Curr. Top. Med. Chem.*, 4, 241–265 (2004).

Rosen, E. M., Fan, S., & Isaacs, C. (2005). BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocrine-related cancer*, 12(3), 533-548.

Salerno, S., Da Settimo, F., Taliani, S., Simorini, F., La Motta, C., Fornaciari, G., & M Marini, A. (2010). Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as anticancer drugs. *Current medicinal chemistry*, 17(35), 4270-4290.

Sattler M, Verma S, Shrikhande G, Byrne CH, Pride YB, Winkler T, Green®eld EA, Salgia R and Grif®n JD. (2000). *J. Biol. Chem.*, 275, 24273 ± 24278.

Shanks, R. M., Lahr, R. M., Stella, N. A., Arena, K. E., Brothers, K. M., Kwak, D. H., Kalivoda, E. J. (2013). A *Serratia marcescens* PigP homolog controls prodigiosin biosynthesis, swarming motility and hemolysis and is regulated by cAMP-CRP and HexS. *PloS one*, 8(3), e57634.

Shin, Dong Hoon, Yong-Joon Choi, and Jong-Wan Park. "SIRT1 and AMPK Mediate Hypoxia-Induced Resistance of Non-Small Cell Lung Cancers to Cisplatin and Doxorubicin." *Cancer research* 74.1 (2014): 298-308.

Skorski, Tomasz. "BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability." *Oncogene* 21.56 (2002): 8591.

Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, Nieborowska- Skorska M, Hoser G, Nowicki MO, Pierce AJ, Fishel R and Skorski T. (2001). *Mol. Cell*, 8, 795 ± 806.

Sawyers CL. (1997). *Baillieres Clin. Haematol.*, 10, 223 ± 231.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.

Tao, W., Shi, J. F., Zhang, Q., Xue, B., Sun, Y. J., & Li, C. J. (2013). Egr-1 enhances drug resistance of breast cancer by modulating MDR1 expression in a GGPPS-independent manner. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 67(3), 197-202.

Willers, Henning, et al. "Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer." *The Cancer Journal* 19.3 (2013): 200-207.

Danificação genômica comparativa dos antitumorais prodigiosina e doxorrubicina, em diferentes linhagens tumorais

Lapenda, J.C.L.¹, Adam, M.L.², Nascimento, S.C.³

¹ Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Author for correspondence:

¹Jeanne Cristina Lapenda Lins, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife-PE, Brasil. Fone.: 81-2126 8346; Ramal: 207 ou (81) 8859 4299 ou (81) 9873 5029.

E-mail: jeannecantalice@gmail.com

Danificação genômica comparativa dos antineoplásicos prodigiosina e doxorrubicina, em diferentes linhagens tumorais

Lapenda, J.C.L.¹, Adam, M.L.², Nascimento, S.C.³

¹ Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro acadêmico de Vitória, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Resumo

Doxorrubicina e prodigiosina são produtos naturais que destacam-se por apresentar ação antitumoral. A doxorrubicina tem induzido a regressão progressiva de diversos tipos de tumores como câncer de mama, colón do útero, cólon, intestino, pulmão, laringe e próstata. A prodigiosina tem sido conferida semelhante ação antineoplásica induzindo apoptose em linfócitos T e B e leucemias mielóides crônicas. A importância da investigação dos efeitos genotóxicos da prodigiosina e doxorrubicina faz-se necessária uma vez que, no caso da doxorrubicina, esta já se encontra sendo empregada nas terapias antineoplásicas enquanto que a prodigiosina tem sido fortemente sugerida como uma droga antitumoral. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo comparar a atividade citotóxica do antineoplásico doxorrubicina com o pigmento natural, prodigiosina produzido por *Serratia marcescens* UFPEDA 398. A atividade genotóxica da prodigiosina foi avaliada a partir dos ensaios de micronúcleo e cometa. Foi observado similar efeito genotóxico para ambas as drogas doxorrubicina e prodigiosina. A doxorrubicina e prodigiosina apesar de apresentarem potencial efeito citotóxico demonstram alvo de ação inespecífico causando danificação genômica tanto nas linhagens tumorais quanto nas células normais, sendo a prodigiosina um pouco mais genotóxica do que a doxorrubicina. Esses dados sugerem a realização de estudos futuros que demonstrem mecanismos de ação alvo-específicos da prodigiosina visando potencializar a sua atividade genotóxica apenas para as células tumorais.

Palavras-chave: Antineoplásicos, Doxorrubicina, Prodigiosina, Linhagens tumorais.

Introdução

Estudos de genotoxicidade revelam o nível de danificação genômica que uma droga é capaz de induzir no DNA celular. Tais danos podem ser reparáveis ou não. Quando os danos são reparáveis a célula tem o seu ciclo celular bloqueado, possibilitando o processo de reparação. Todavia, quando o dano é irreparável pode ocorrer a indução do mecanismo de apoptose ou consequências mais graves como as mutações que, neste último caso, são as principais causas de aparecimento dos tumores (Yamashit et al., 2010). Este mesmo princípio é utilizado para a seleção de agentes antitumorais (Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Pérez-Tomás e Viñas, 2010; Yoshida e Miki, 2010).

A quimioterapia tem como principal objetivo promover a regressão do tumor. Esta consiste na utilização de diversos fárcamos com ação antitumoral que podem ser empregados em sua natureza química pura ou conjugado a outras substâncias (Rade e Strukelj et al., 2008).

A doxorubicina, uma antraciclina produzida pelo microrganismo *Streptomyces peucetius*, apresenta potencial efeito antitumoral levando à regressão de diversos tumores sólidos como o de laringe, pulmão, colo do útero, cólon, intestino, mama, bem como as leucemias (Falcão-Pires et al., 2013). Esta droga apresenta potencial citotoxicidade, induzindo a apoptose em células tumorais, em doses muito baixas (IC₅₀ 0,2 µg/ mL). Tal efeito tem sugerido, hipoteticamente, que este antineoplásico induz danos genômicos irreversíveis, promovendo, desta forma, a ativação do mecanismo de morte celular (Fardilha et al., 2014). Semelhante ação tem sido descrita para o alcalóide natural prodigiosina produzido por *Serratia marcescens*.

A prodigiosina, um pigmento vermelho natural, tem sido bastante descrita, nos últimos cinco anos, pelas suas diversas atividades biológicas como antimicrobiana, algicida, antimalarial, anti-tripanosossomideo e, principalmente, antitumoral, induzindo linhagens tumorais a iniciarem os mecanismos de apoptose (Montaner et al., 2005). O mecanismo

apoptótico induzido pela prodigiosina em linhagens tumorais independe de proteínas reguladoras, denominadas pró-apoptóticas (*p53*). Estudos têm sugerido que tais mecanismos citotóxicos estejam correlacionados a possíveis danos no DNA das linhagens tumorais. Entre esses mecanismos se encontram a indução a quebra das fitas duplas do DNA e inibição das topoisomerasas I e II de forma irreversível. Ambos mecanismos, conseqüentemente, podem ativar o mecanismo de morte celular, a apoptose (Sumathi et al., 2014).

A importância da investigação dos efeitos genotóxicos da prodigiosina e da doxorrubicina faz-se necessária uma vez que, no caso da doxorrubicina, esta já tem sido empregada nas terapias antineoplásicas (Cancerquest, 2013; Miskovic et al, 2013), enquanto que a prodigiosina tem sido fortemente sugerida como uma droga antitumoral com considerável seletividade (Montaner et al., 2000; Salerno et al, 2010; Chang et al, 2011; Miskovic et al, 2013; Fineran et al., 2013). Entretanto, tratamentos com agentes genotóxicos estão sempre associados ao risco de toxicidade. Os tratamentos genotóxicos são direcionados para as células potencialmente em divisão, como a maioria das células tumorais. Porém, tal terapia pode afetar, embora em menor grau, todas as células capazes de se dividir, principalmente aquelas com um índice mitótico naturalmente rápido.(Petkova et al, 2014).

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo comparar a atividade genotóxica dos antineoplásicos doxorrucina e prodigiosina, visando um melhor direcionamento da utilização destes agentes genotóxicos na terapia anticâncer.

Material e métodos

Células e condições de cultura

Foram empregadas, neste estudo, as seguintes linhagens tumorais: NCIH-292 (Carcinoma mucoepidermoide de pulmão), MCF-7 (Adenocarcinoma de mama) e HL-60 (Leucemia promielocítica humana). Como controle, a linhagem de células normais utilizada foi

a BGMK (Célula normal de rim de macaco). Todas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Culturas de Células e Ensaio farmacológicos, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

As linhagens foram cultivadas (2×10^5 células/ mL) em frascos (25 cm^2 / 60 mL) para cultura de tecidos, contendo o meio Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (DMEN, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI / mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM e incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Obtenção da doxorrubicina e prodigiosina

A doxorrubicina foi obtida a partir do medicamento Cloridrato de Doxorrubicina – 50mg – pó liofilizado (Singular Medicamentos Especiais), na rede de drogarias local.

A prodigiosina foi produzida a partir do microrganismo *Serratia marcescens*, pelo Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos, da Universidade Federal de Pernambuco (Brasil), e, gentilmente, cedida para este estudo. A mesma foi previamente purificada e caracteriza por espectrofotometria UV-vis e espectrofotometria de massa GCMS conforme descrito por Nakashima et al., (2006 e 2008).

Ensaio de genotoxicidade para ambas as drogas em linhagens tumorais

O efeito genotóxico de ambas as drogas antitumorais, doxorrubicina e prodigiosina, foi avaliado pelos Ensaio Cometa e Micronúcleo, segundo o método descrito por Morris et al., (2002) e Tice et al., (2000) com modificações, e Fenech e colaboradores (1993), respectivamente.

Tratamento das culturas celulares e período de exposição

Cerca de 2×10^5 células por mL das linhagens NCIH- 292, MCF-7, HL-60 e a linhagem normal BGMK foram cultivadas em microplacas de 24 poços em meio acima especificado (1 mL/ poço), e incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ , durante 24 horas.

Após o período de incubação, foram adicionadas as soluções de doxorrubicina nas concentrações 0,1, 0,2, e 0,4 µg/ mL e de prodigiosina nas concentrações de 1,7; 3,4 e 6,8 µg/ mL, para cada tratamento independente referente a cada linhagem celular. As concentrações de ambas as drogas empregadas nestas análises foram calculadas com base na determinação prévia da IC₅₀ de cada uma (Lapenda, 2014), onde foram testadas, além da concentração relativa ao IC₅₀ , a dose reduzida a metade e a duplicada em relação ao IC₅₀. Após este período, o meio foi aspirado e as células foram lavadas com 300 µL de solução tampão (PBS, pH 7,2) e, em seguida, tratadas com 300 µL de tripsina/EDTA. Posteriormente, para inativação da tripsina, foi adicionado 600 µL de meio DEMEN e em seguida, as amostras foram aspiradas e transferidas para tubos de Eppendorf para o posterior processamento.

Para o processamento das amostras, inicialmente, as mesmas foram lavadas com 60 µL de solução tampão (PBS, pH igual a 7,2) e centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, o meio de cultura foi desprezado e as células foram ressuspensas com 60 µL de PBS, estando a solução celular adequada para o sua aplicação nos testes genotóxicos.

Teste de micronúcleo (Micronuclei assay)

Duas gotas da suspensão celular foram transferidas para lâminas previamente lavadas e ainda molhadas, realizando um esfregão, sendo mantidas na posição horizontal até a sua

secagem na temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto (P.A) por 5 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente e submetidas à coloração com a utilização do corante Giemsa (Merck), o qual foi depositado de forma uniforme sobre as lâminas, por um tempo médio de 5 minutos, sendo, posteriormente, novamente lavadas com água corrente e secas à temperatura ambiente.

Ensaio cometa (Comet assay)

Cerca de 15 μL da suspensão celular foi homogeneizada em 100 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LM) previamente aquecida em banho maria a 37 °C. Em seguida, o homogeneizado foi transferido para lâminas de vidros revestidas de agarose padrão, cobertas com lamínulas e incubadas por 10 minutos sob refrigeração a 4 °C. Após este período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise por 2 horas sob refrigeração a 4°C. Transcorridas as duas horas, as lâminas foram submetidas a eletroforese (40 V por 20 minutos e a 300 mA). Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de neutralização por 15 minutos e, posteriormente, fixadas em solução de etanol absoluto por 5 minutos. Em seguida, após a secagem, foram armazenadas em geladeira até o momento da coloração. Para coloração foi empregado o corante Gel Red (Biotarget GelRed®), onde 1 μL docorante foi homogeneizado em 1000 μL de água deionizada estéril (1 : 1000). As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus -Série BX) e em seguida, foram realizadas as contagens celulares onde cerca de 100 células por indivíduos tratados foram analisados, sendo atribuídos escores de 0 – 4, conforme o nível de dano no nucleóide.

Testes Estatísticos

A homocedasticidade de todos os conjuntos de dados analisados foi testada pelo teste de Bartlett (nível de significância 0,05).

Comparações entre os Índices de Danos, Frequências de Danos e Frequências de Células Micronucleadas apresentados para a Doxorubicina e Prodigiosina foram realizadas através da ANOVA (nível de significância 0,05) para o total de danificação apresentado por concentração, em uma análise conjunta de todas as linhagens/concentração. As mesmas comparações foram realizadas pela ANOVA (nível de significância 0,05) para as linhagens tumorais e a linhagem normal independentemente.

Para a comparação dos três parâmetros metodológicos em relação à cada linhagem celular e a concentração específica de cada droga foi testada pelo teste Qui-Quadrado (X^2), com nível de significância 0,05. Foram considerados os valores obtidos nos tratamentos com a Doxorubicin, para os três parâmetros analisados, os valores esperados para a análise do X^2 . Esta medida arbitrária foi aplicada devido ao grande volume de informações disponibilizadas na literatura a respeito da comprovada ação genotóxica da doxorubicina.

Resultados

Todos os parâmetros de danificação genômica abordados neste estudo apresentaram uma relação dose-dependente tanto para os tratamentos com doxorubicina quanto para aqueles com a prodigiosina (Tabelas 1, 2, e 3)

Todos os tratamentos apresentaram normalidade ($p > 0,05$) de seus dados, pelo teste de Bartlett.

As comparações estabelecidas pela ANOVA para as análises conjuntas linhagem/concentração não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento com Doxorrubicina em relação à Prodigiosina, em todos os parâmetros metodológicos avaliados. Estes resultados podem ser observados nas figuras 1 e 3, pelos valores de p obtidos tanto para a ANOVA quanto para o teste *a posteriori* de Tukey. A mesma ausência de significância estatística foi observada quando as comparações foram realizadas por linhagem independentemente, em todos os parâmetros de danificação genômica avaliados (Figuras 2 e 4).

Quando foram comparados os IDs, pelo teste de X^2 , por linhagem e por concentração específica, as linhagens HL60 e BGMK apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os dois tratamentos (Doxorrubicina e Prodigiosina) relativos à concentração IC_{50} de ambas as drogas, e as linhagens HL 60 e NCIH 279 para as concentrações relativas ao dobro do IC_{50} . (tabela 4).

Nas mesmas comparações (X^2) relativas às FDs, a linhagem HL 60 apresentou valores significativos tanto para a IC_{50} quanto para essa dose duplicada. A linhagem NCIH 279 apresentou significancia estatística para a comparação realizada na dosagem duplicada em relação ao IC_{50} . de ambas as drogas, enquanto a BGMK apresentou diferença significativa comparativa para a IC_{50} . das mesmas (tabela 4).

Com a abordagem do parâmetro de danificação quanto ao número de células micronucleadas, as linhagens HL60 e NCIH279 demonstraram diferenças significativas nas comparações IC_{50} . e sua dose em dobro (tabela 5).

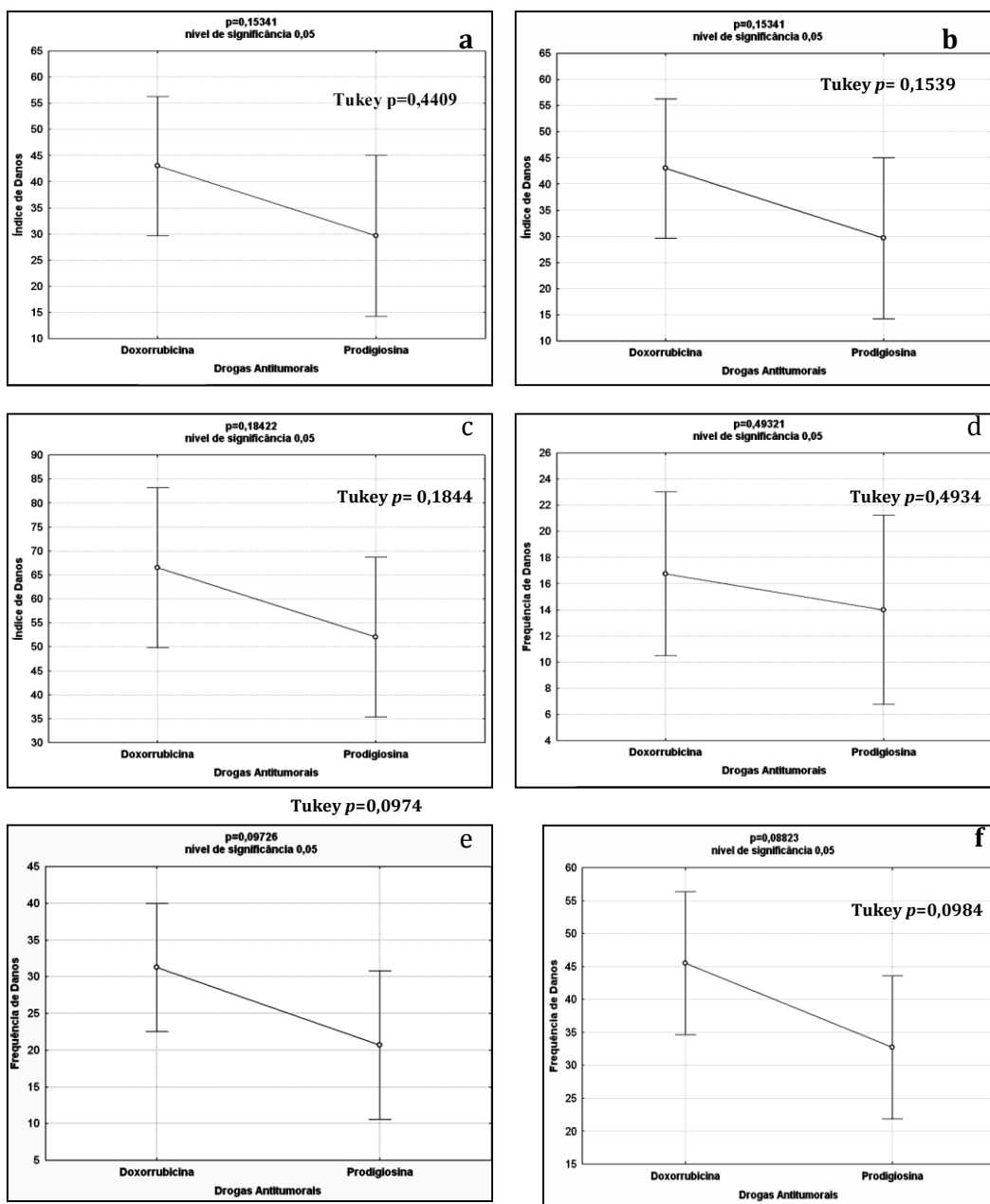


Figura 1. Gráficos das ANOVA estabelecidas nas comparações entre os Índices de Danos, Frequências de Danos para o total de danificação apresentado por concentração, em uma análise conjunta de todas as linhagens/concentração. Valores p obtidos pelo teste a posteriori de Tukey para todas as comparações acima citadas. O nível de significância 0,05 foi aplicado a todos os testes. (a) Comparação dos Índices de Danos para a concentração de ambas às drogas relativas à metade do valor IC_{50} das mesmas; (b) Comparação dos Índices de Danos para a concentração de ambas às drogas relativas ao valor IC_{50} das mesmas; (c) Comparação dos Índices de Danos para a concentração de ambas às drogas relativas ao dobro do valor IC_{50} das mesmas; (d) Comparação das Frequências de Danos para a concentração de ambas às drogas relativas à metade do valor IC_{50} das mesmas; (e) Comparação das Frequências de Danos para a concentração de ambas às drogas relativas ao valor IC_{50} das mesmas; (f) Comparação das Frequências de Danos para a concentração de ambas às drogas relativas ao dobro do valor IC_{50} das mesmas;

Discussão

A terapia antitumoral com agentes genotóxicos tem se destacado pela sua potencialidade na erradicação do tumor. Porém, essa terapia apresenta um custo para o organismo, uma vez que tais agentes podem ocasionar danos no DNA de células normais, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (Petkova et al, 2014; Cellera et al, 2014).

Neste sentido, esforços tem sido empregados para a descoberta de drogas, principalmente as naturais, que apresentem um elevado potencial antitumoral com relativa seletividade. Com este objetivo, o presente estudo comparou a genotoxicidade das drogas doxorubicina e prodigiosina, na tentativa de caracterizar qual das mesmas se enquadra no pressuposto acima.

De maneira geral, ambas as drogas equipararam-se, em relação à sua ação genotóxica nas linhagens tumorais e normal, quando foram realizadas comparações em um nível mais amplo, como demonstraram os resultados obtidos. Provavelmente, essa similaridade se deva ao mecanismo de indução de danificação genômica de ambas as drogas, serem similares. Tanto a doxorubicina quanto a prodigiosina são agentes intercalantes do DNA, com ação inibitória das topoisomerasas I e II, com consequente danificação genômica (Montaner et al, 2003; Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Marverti et al, 2008; Miskovic et al, 2013).

Tabela 1. Índices de Danos Genômicos apresentados por linhagem celular em relação às diferentes concentrações ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de Doxorrubicina e Prodigiosina.

Doxorrubicina					Prodigiosina				
Linhagens celulares					Linhagens celulares				
$\mu\text{g} / \text{mL}$	HL60	NCIH279	MCF7	BGMK	$\mu\text{g} / \text{mL}$	HL60	NCIH279	MCF7	BGMK
0,1	26	21	14	32	1,7	25	14	17	22
0,2*	52	35	29	56	3,4*	34	28	27	37
0,4	80	68	42	76	6,8	54	55	39	60

*IC⁵⁰

Tabela 2. Frequências de Danos Genômicos apresentados por linhagem celular em relação às diferentes concentrações ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de Doxorrubicina e Prodigiosina.

Doxorrubicina					Prodigiosina				
Linhagens celulares					Linhagens celulares				
$\mu\text{g} / \text{mL}$	HL60	NCIH279	MCF7	BGMK	$\mu\text{g} / \text{mL}$	HL60	NCIH279	MCF7	BGMK
0,1	22	16	11	21	1,7	18	11	13	18
0,2*	37	26	22	40	3,4*	23	19	20	27
0,4	52	49	29	52	6,8	34	31	26	40

*IC⁵⁰

Tabela 3. Números de células micronucleadas apresentados por linhagem celular em relação às diferentes concentrações ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de Doxorubicina e Prodigiosina.

Doxorrubicina					Prodigiosina				
Linhagens celulares					Linhagens celulares				
$\mu\text{g} / \text{mL}$	HL60	MCF7	NCIH279	BGMK	$\mu\text{g} / \text{mL}$	HL60	MCF7	NCIH279	BGMK
0,1	20	14	20	23	1,7	12	8	17	16
0,2*	24	21	44	43	3,4*	21	18	29	30
0,4	37	33	76	68	6,8	38	27	40	48

*IC⁵⁰

Tabela 4. Valores de p , obtidos pelo X^2 , para a comparação dos Índices e Frequências de Danos Genômicos apresentados por linhagem celular em relação às diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de Doxorubicina e Prodigiosina.

Índice de Danos					Frequência de Danos				
Linhagens celulares					Linhagens celulares				
$\mu\text{g} / \text{mL}$	HL60	NCIH279	MCF7	BGMK	$\mu\text{g} / \text{mL}$	HL60	NCIH279	MCF7	BGMK
(D/P)					(D/P)				
0,1/1,7	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	0,1/1,7	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
0,2/3,4¹	$p < 0,025^*$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,025^*$	0,2/3,4¹	$p < 0,025^*$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
0,4/6,8	$p < 0,001^*$	$p < 0,001^*$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	0,4/6,8	$p < 0,025^*$	$p < 0,01^*$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

(D/P) doxorubicina/prodigiosina; 1. IC⁵⁰; * valores significativos (nível de significância 0,05)

Tabela 5. Valores de p , obtidos pelo X^2 , para a comparação dos números de células micronucleadas apresentados por linhagem celular em relação às diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de Doxorubicina e Prodigiosina

D/P ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Linhagens celulares			
	HL60	MCF7	NCIH279	BGMK
0,1/1,7	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$
0,2/3,4¹	$p<0,05^*$	$p>0,05$	$p<0,025^*$	$p>0,05$
0,4/6,8	$p<0,025^*$	$p>0,05$	$p<0,001^*$	$p>0,05$

D/P) doxorubicina/prodigiosina; 1. IC₅₀; * valores significativos (nível de significância 0,05)

Entretanto, quando as comparações foram estabelecidas de maneira mais refinada, ou seja, por linhagem celular, particularidades foram observadas em relação à resposta genotóxica de ambas as drogas. Lesões no DNA e o seu mecanismo de reparo podem depender da origem do tumor, da capacidade individual de reparo do DNA, e da droga utilizada (Skorski, 2002; Petkova et al, 2014). Os resultados obtidos apontam para essa relação, onde a linhagem HL 60 apresentou maior sensibilidade para ambos os tratamentos na concentrações IC₅₀ e seu dobro, em todos os parâmetros de danificação genômica avaliados, sendo os maiores danos observados no tratamento com a doxorubicina. A linhagem NCIH 279 respondeu com maiores índices e frequências de danos provocados pela doxorubicina apenas na concentração do dobro de IC₅₀. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois tratamentos, em todas as dosagens, para a linhagem tumoral MCF 7.

A grande preocupação quanto à danificação genômica induzida por ambas as drogas e o seu balanço entre a ação tumoral e a seletividade celular, pode ser atribuída ao fato de que as células normais são também induzidas ao mesmo tipo de danificação induzida nas células

tumorais. (Ptekova et al, 2014). Este tipo de danificação pode ser observado na linhagem normal BGMK, onde as IC_{50} foram capazes de induzir uma maior danificação, em ambos os tratamentos. O tratamento com a doxorrubicina se destacou quantitativamente na indução de danos nestas células, conforme as diferenças estatísticas observadas para os IDs e FDs, comparativamente ao tratamento com a prodigiosina. Convém ressaltar que apesar de não terem sido observadas diferenças estatística entre ambos os tratamentos, quando se refere ao dobro da IC_{50} , as células normais apresentaram um elevado grau de danificação induzido por ambas as drogas, com um nível mais acentuado favorecendo o tratamento com a doxorrubicina. Este resultado sugere uma maior ação seletiva tumoral por parte da prodigiosina, estando de acordo com várias pesquisas já realizadas (Montaner et al, 2000; Montaner e Pérez-Tomás, 2001; Campás et al, 2003). Entretanto, os maiores valores de danificação genômica encontrados na linhagem BGMK em comparação às linhagens tumorais, observados em relação a todas as concentrações de prodigiosina avaliadas, sugerem uma baixa seletividade tumoral desta droga. Porém, quando esta comparação se realiza em relação à danificação induzida por ambas as drogas na linhagem celular normal, os valores mais altos são observados, em geral, nos tratamentos com a doxorrubicina, sugerindo uma menor seletividade tumoral comparativa à da prodigiosina.

A doxorrubicina, além de provocar danos no DNA pela inibição das topoisomerasas I e II, pode induzir danificação genômica por outros mecanismos. Segundo Akman et al., (1992) e Manjanatha e colaboradores (2014), a doxorrubicina pode atuar indiretamente na indução de danos na molécula de DNA. Esse efeito é uma consequência da produção de radicais livres através da reação de oxidação da droga ou a interação da droga com ferro livre no citossol. A metabolização da doxorrubicina no fígado é acompanhada pela produção de superóxido, que pode desencadear uma série de reações que geram radicais hidroxila altamente tóxicos. (Herman et al, 1998; Mizutani et al, 2003; Todorova et al, 2010),

reativos à molécula de DNA. Assim, os resultados observados para o tratamento com a doxorubicina, apontam para uma maior toxicidade desta droga, mediante aos seus diversos mecanismos atuantes para a danificação do material genético celular, independente da transformação maligna.

Conclusão

As comparações estabelecidas no presente estudo podem contribuir para o melhor direcionamento das terapias genotóxicas, mediante a identificação de drogas com menor toxicidade sistêmica e maior seletividade tumoral.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos que contribuíram de forma direta e indireta na realização deste trabalho. Agradecemos aos órgãos de fomento como CAPES, FACEPE e CNPq e a Universidade Federal de Pernambuco, seus técnicos e colaboradores.

Referências

Campa C, M Dalmau², B Montaner³, M Barragán¹, B Bellosillo⁴, D Colomer⁴, G Pons¹, R Pérez-Tomás³ and J Gil Leukemia . Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. (2003) 17, 746–750

Cerella C.A, Teiten M.T A, Radogna F.A, Dicato M.A, Diederich M. Biotechnology Advances From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment (2014).

Fardilha, M., Figueiredo, J., Espona-Fiedler, M., Felgueiras, J., Korrodi-Gregório, L., Esteves, S. L., Pérez-Tómas, R. (2014). Phosphoprotein Phosphatase 1 Isoforms Alpha and Gamma Respond Differently to Prodigiosin Treatment and Present Alternative Kinase Targets in Melanoma Cells. *Journal of Biophysical Chemistry*, 5(02), 67.

Marverti G, Cusumano M, Ligabue A, Di Pietro ML, Vainiglia PA, Ferrari A, Bergomi M, Moruzzi MS, Frassinetti C. Studies on the anti-proliferative effects of novel DNA intercalating bipyridyl-thiourea-Pt (II) complexes against cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. *J Inorg Biochem* 2008;102:699-712. PMID: 18082268.

Miscovic K, Bujah M, Loncar M.B, Obravac G. L. (2013). Antineoplastic DNA-binding compounds intercalating and minor groove binding drugs *Arh Hig Rada Toksikol* 2013;64:593-602

Montaner B, Navarro S, Pique M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E et al. Prodigiosin from supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 583–593.

Montaner B and Pérez-Tomás, R. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sciences* 68 (2001) 2025–2036

Montaner, B, Pérez-Tomáz R. The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets*. 2003.3(1):57-65.

Montaner, B., Castillo-Ávila, W., Martinell, M., Öllinger, R., Aymami, J., Giralt, E., Pérez-Tomás, R. (2005). DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicological Sciences*, 85(2), 870-879.

Palchaudhuri R and Hergenrother P.J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18:497–503.

Pires F, I., et al. "Myofilament changes in doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy." *European Journal of Heart Failure*. 111 River ST, Hoboken 07030-5774, NJ USA: Wiley-Blackwell, 2013.

Rade, I, and Strukelj, B. "Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity." *Technology in cancer research & treatment* 7.6 (2008): 497-516.

Sumathi, C., MohanaPriya, D., Swarnalatha, S., Dinesh, M. G., & Sekaran, G. (2014). Production of Prodigiosin Using Tannery Fleshing and Evaluating Its Pharmacological Effects. *The Scientific World Journal*, 2014.

Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Morishita, Y., Yoshida, T., Fujimura, M., & Tsutsumi, Y. (2010). Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. *Inflammation*, 33(4), 276-280.

Yoshida, Kiyotsugu, and Yoshio Miki. "The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage." *Cancer science* 101.4 (2010): 831-835.

Evidências da genotoxicidade da prodigiosina em *Drosophila melanogaster*, um modelo animal em estudos genômicos.

Lima, C.D.S¹; Verçosa, C. J¹; Lapenda, J.C.L²; Rohd, C¹; Adam, M.L³

¹ Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente – Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.

³ Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental – Universidade Federal de Pernambuco – Brasil.

Artigo submetido a revista *Molecules*

² **Autor para correspondência**

² Jeanne Cristina Lapenda Lins, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil. Email: jeannecantalice@gmail.com.

Evidências da genotoxicidade da prodigiosina em *Drosophila melanogaster*, um modelo animal em estudos genômicos.

Lima, C.D.S¹; Verçosa, C. J¹; Lapenda, J.C.L²; Rohd, C¹; Adam, M.L³

¹ Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente – Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.

³ Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental – Universidade Federal de Pernambuco – Brasil.

Resumo

A prodigiosina é um pigmento vermelho natural produzido por *Serratia marcescens* que pertence a família das prodigininas. Este metabólito secundário é caracterizado quimicamente como sendo um alcaloide de estrutura química $C_{20}H_{25}N_3O$ cujo peso molecular é igual a 323. Nos últimos anos, tem sido observados muitos estudos sobre este pigmento devido as suas diversas atividades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica, antimalárica, algicida e antitumoral sendo observados efeitos apoptóticos e genotóxicos em linhagens celulares tumorais. Com base no descrito acima o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito genotóxico da prodigiosina em *Drosophila melanogaster*. Inicialmente, foram realizados cultivo in vitro de *D. melanogaster* (macho e fêmea) para posterior acasalamento e obtenção das larvas. Os organismos adultos foram incubados por 11 dias a 30 °C juntamente com a adição da prodigiosina em diferentes concentrações (2, 5 e 10 µM/mL) em meio de cultura complexo. Em seguida, foram obtidas as larvas onde estas foram lavadas e separadas para posterior extração da hemolinfa e isolamento dos hemócitos. Após a obtenção dos hemócitos, foi realizado o ensaio de genotoxicidade, ensaio cometa. Foram observados significativos efeitos genotóxicos para a prodigiosina em *D. melanogaster*, evidenciado pelo índice de dano (ID) e frequência de dano (FD) observados em todos os tratamentos. Foi observado um aumento linear do ID e FD em relação ao aumento da concentração de prodigiosina. Contudo, o mesmo comportamento não foi observado para alguns grupos de *D. melanogaster* onde observou-se que na concentração de 10 µM/mL houve uma significativa diminuição do ID e FD, sugerindo a resistência destes grupos estudados. Efeitos citotóxicos foram evidenciados pela observação da retardo do desenvolvimento larval. A prodigiosina é um forte agente genotóxico induzindo danificação direta ao DNA nuclear de *Drosophila melanogaster* e ainda, interferindo no ciclo biológico celular induzindo retardos do desenvolvimento larval. Assim, as evidências dos efeitos genotóxicos observados nos hemócitos de *D. melanogaster*, aqui demonstrados, sugerem a necessidade de maiores investigações sobre os reais efeitos da prodigiosina em células normais, para melhor assegurar a eficiência seletiva desta droga como um agente antitumoral.

Palavras-Chave: Genotoxicidade. Ensaio cometa. *Drosophila melanogaster*.

Introdução

A prodigiosina é um pigmento vermelho natural produzido pela bactéria *Serratia marcescens*. Este trata-se de um alcalóide de estrutura química (Figura 1) correspondente a $C_{20}H_{25}N_3O$ e peso molecular de 324 m/z. Este pigmento vermelho pertencente à família das prodigininas, cujos membros apresentam em comum três anéis pirróis em sua estrutura química (Guryanov et al., 2013). Devido às suas diversas propriedades biológicas, tais como antimicrobianas, algicida, antitumoral induzindo apoptose em linfócitos T e B, antimalarial, antitripanossomídeo, efetividade no controle biológico de pragas e ainda o seu emprego como pigmento para tingir tecidos, látex e plásticos como o polietileno (PET), a prodigiosina tem despertado o crescente interesse pela sua potencial utilização nas diversas áreas como médica, farmacêutica, ambiental e industrial (Campás et al., 2003; Pérez-Tomáz and Viñas, 2010; Montaner et al., 2005; Genes et al., 2011; Lu et al., 2012; Venil et al., 2013).

Bactérias do gênero *Serratia* sp, produtoras de prodigiosina, podem ser encontradas oportunamente colonizando, de forma patogênica, o trato gastrointestinal de insetos como Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Diptera e, desta forma, induzir efeito citotóxico para estas classes (Sikorowski et al., 2001). Em adicional, Rahul e colaboradores (2014), demonstraram a citotoxicidade da prodigiosina em insetos da classe Lepidoptera, família Noctuidade.

A propriedade antitumoral da prodigiosina tem se destacado entre as pesquisas devido à sua ação específica e direcional às células tumorais. Estudos têm relatado pouca toxicidade da prodigiosina para as células normais, conferindo, assim, grande vantagem para a utilização desta droga como um agente anticâncer (Pandey et al, 2009; Pérez-Tomás e Viñas, 2010; Hsieh et al, 2012).

Um outro gênero de insetos bastante estudado é o *Drosophila* sp, no qual destaca-se a espécie *D. melanogaster*, por ser um modelo animal empregado, há muito tempo, em estudos de transmissão dos caracteres hereditários, ligações cromossômicas, efeitos genéticos das radiações, interações genéticas, aberrações cromossômicas e mudanças evolutivas em populações (Freire-Maia e Pavan, 1949; Strickberger, 1962; Lee et al, 2013; Singh et al, 2013; Lavington et al, 2014; Campos 2014).

Neste sentido, com base na observação das inúmeras atividades biológicas descritas para a prodigiosina, bem como seus efeitos citotóxicos e, principalmente, a sua questionável ação direcional e específica para células tumorais, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos genotóxicos, da prodigiosina, utilizando o modelo animal em *Drosophila melanogaster*, tendo em vista que os resultados aqui obtidos podem ser extrapolados para outros organismos.

Material e Métodos

Cultivo in vitro de Drosophila melanogaster

Este protocolo de cultura seguiu o método descrito por Ui e colaboradores (1989) e Moraes e colaboradores (2012). Cerca de (quantos machos e quantas fêmeas?) moscas (*Drosophila melanogaster*) foram cultivadas em laboratório, em frascos de vidro, contendo meio de cultura (25g farinha de milho, 10g farinha de centeio, 5g ágar, 500mL água destilada, 1g nipagim dissolvido em álcool, 50g fermento biológico e 50g de açúcar), e a prodigiosina em diferentes concentrações (2, 5 e 10 μ M/ mL), sendo mantidas a temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$). Cada frasco recebeu a quantidade 15mL de meio e 0,4mL da substância teste. Cada um dos tratamentos, incluindo o grupo controle (ausência de prodigiosina no meio) foi realizado em triplicata. A obtenção das larvas em terceiro estágio (E₃) ocorreu após onze dias de exposição

do adulto à prodigiosina. Para extração da hemolinfa, retirou-se do frasco 60 larvas, as quais foram lavadas por duas vezes com água destilada e logo após foram resfriadas a 4°C por 1 minuto. Logo após o resfriamento as larvas foram postas em placas multipoços (6 poços/placa), previamente sendo adicionada às mesmas uma solução de EDTA (200mL de água destilada, 14,89g de EDTA, ~3g de NaOH para ajuste final do pH igual a 10), para evitar a coagulação da hemolinfa. Em seguida, as larvas foram levadas ao microscópio estereoscópico (Lupa) e, com a ajuda de um bisturi (Lâmina de aço de 11 mm para procedimentos cirúrgicos) e uma pinça de relojoeiro nº5, foi feito o corte lateral na cutícula de cada indivíduo, permitindo o escoamento da hemolinfa. Logo em seguida, todo material depositado no fundo da placa multipoços foi retirado com a ajuda de uma micropipeta e colocado em tubos de microcentrífuga (1,5 mL), sendo, posteriormente, centrifugados. A hemolinfa de cada indivíduo contribuiu para a formação de um *pool* celular por tratamento, uma vez que a hemolinfa dos mesmos foram colocadas em um mesmo frasco. Esta metodologia se fez necessária devido ao baixo volume de hemolinfa obtido de cada indivíduo. O volume final de cada tubo contendo a solução de EDTA e a hemolinfa foi equivalente a 0,5 mL. O mesmo foi submetido à centrifugação por duas vezes a 3000 rpm por 3 minutos. Sendo descartado o sobrenadante na primeira lavagem, completou-se o volume com EDTA (0,5 mL) para a segunda centrifugação. Esse procedimento se faz necessário para que após a lavagem celular todas as impurezas sejam eliminadas, aumentando a qualidade das amostras.

Ensaio de genotoxicidade em D. melanogaster

A avaliação da danificação genômica foi realizada pelo Ensaio Cometa, segundo Singh e colaboradores (1988) com modificações. Cerca de 30µL da suspensão celular foi homogeneizada em 100µL de agarose de baixo ponto de fusão (*LM*), previamente aquecida em

banho maria a 37°C. Em seguida, o homogeneizado foi transferido para lâminas de vidros revestidas de agarose padrão, cobertas com lamínulas e incubadas por 15 minutos sob refrigeração a 4°C. Após este período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise por 72 horas, sob refrigeração a 4°C. Transcorridas as duas horas, as lâminas foram submetidas a eletroforese (34V por 20 minutos e a 300mA). Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de neutralização por 15 minutos e, posteriormente, fixadas em solução de etanol absoluto por 5 minutos. Em seguida, após a secagem, foram armazenadas em geladeira até o momento da coloração. Para coloração foi empregado o corante Gel Red (Biotarget GelRed®), onde 1µL do corante foi homogeneizado em 1000µL de água deionizada estéril (1:1000). As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Imager M2 ZEISS), realizando as contagens celulares, onde cerca de 500 células por *pool* celular foram analisados, sendo atribuídos escores de 0 – 4, conforme o nível de dano no nucleóide.

Análise dos dados

O Índice de Danos e a Frequência de Danos obtidos no Ensaio Cometa foram estabelecidos para todos os tratamentos. A homocedasticidade das amostras foram testadas pelo Teste de Bartlett, com nível de significância 0,05. Para a comparação das amostras foi empregado o teste ANOVA (nível de significância 0,05).

Resultados

A homocedasticidade dos dados obtidos, tanto para o Índice de Danos quanto para Frequência de Danos, foi testada pelo teste de Bartlett. Em todos os casos, os dados

apresentaram distribuição normal ($p>0,05$) sendo os dados, portanto, submetidos à comparação pela ANOVA.

Os valores do ID e FD nos diferentes tratamentos estão demonstrados na tabela 1.

A análise comparativa em relação ao grupo controle, para o ID e a FD, mostrou resultados significativos ($p<0,05$) na análise conjunta (Figura 1 e 2).

Pelo teste *a posteriori* de Tukey, observou-se que o tratamento na concentração 5 $\mu\text{M/mL}$ não apresentou diferença significativa para ambos os parâmetros (ID e FD; $p>0,05$) em relação ao grupo controle (tabela 2). Da mesma maneira, a comparação entre o tratamento 10 $\mu\text{M/mL}$ e o grupo controle não apresentou diferença significativa para o parâmetro FD, apesar do valor de p ($p=0,06$) estar muito próximo do nível de significância ($p<0,05$).

A comparação entre os tratamentos 2 $\mu\text{M/mL}$, 5 $\mu\text{M/mL}$ e 10 $\mu\text{M/mL}$ para o ID não apresentaram diferenças significativas. Porém, a mesma comparação estabelecida para FD mostrou diferenças significativas entre os tratamentos 2 $\mu\text{M/mL}$ e 5 $\mu\text{M/mL}$.

Foi observada uma mortalidade diferencial larval no tratamento 5 $\mu\text{M/mL}$ em relação aos demais. Porém, esse dado não foi quantificado.

Discussão

As gerações mais recentes de medicamentos têm focado na minimização de efeitos colaterais, apresentando seletividade para o seu sítio de ação. Neste sentido, é crescente a preocupação com a elaboração de drogas antitumorais com efeito seletivo para linhagens celulares anormais. (Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Lu et al, 2012) A prodigiosina se encontra entre os produtos naturais com aplicação seletiva no tratamento do câncer (Yamamoto

et al, 2000; Campás et al, 2003; Soto-Cerrato et al, 2004; Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Pérez-Tomás e Viñas, 2010; Lu et al, 2012).

Visando testar a real seletividade de ação da prodigiosina, principalmente pela sua utilização no tratamento do câncer, o presente estudo focou na possível ação genotóxica desta droga em células normais, utilizando o modelo animal *Drosophila melanogaster*. Os resultados apresentados sugerem uma ação não seletiva da prodigiosina, tendo em vista que as diferentes concentrações da prodigiosina, aqui avaliadas, foram capazes de causar danos no material genético dos hemócitos de *D. melanogaster*, evidenciados pelo Índice de Dano (ID) e Frequência de Danos (FD) dos nucleóides observados no Ensaio Cometa.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade antitumoral da prodigiosina, entre os quais a morte celular por apoptose induzida ou não por danificação genômica tem se destacado (Campás et al, 2003; Montaner et al, 2005; Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Lu et al, 2012). A danificação genômica causada pela prodigiosina se deve à sua característica de agente intercalante na molécula de DNA. Sem discriminação entre regiões AT e CG, porém com afinidade às regiões com pares de bases alternantes (Montaner et al, 2005). Como consequência de sua ligação ao DNA, a prodigiosina inibe a ação das Topoisomerasas I e II, resultando em quebras na molécula de DNA, principalmente as quebras na dupla-fita (DBS). Tais quebras puderam ser quantificadas no presente estudo, pela avaliação dos diferentes escores de danificação genômica observados em todos os tratamentos avaliados. Não foi observada uma associação dose-resposta das concentrações avaliadas, onde a maior quantificação relativa de danos foi observada na concentração 2 $\mu\text{M/mL}$, como demonstrada pelas médias relativas dos diferentes níveis de danos (escores 1-4) e pelas discrepâncias das diferenças significativas em relação ao grupo controle observadas, como demonstradas pelo teste *a posteriori* de Tukey.

Considerando a concentração 5 $\mu\text{M/mL}$, a falta de significância estatística observada para ambos os parâmetros analisados (ID e FD), apontam para uma associação com a mortalidade larval diferencial observada e a provável presença de indivíduos resistentes à droga. Embora células possam se adaptar a baixos níveis de danificação irreparável, uma única DBS pode ser suficiente para matar a célula se a mesma inativar genes essenciais ou induzir a apoptose (Khanna e Jackson, 2001), uma vez que o reparo deste tipo de lesão é intrinsicamente mais difícil que de outros tipos de danos no DNA (Pérez-Tomás e Viñas, 2010). Assim, a mortalidade larval observada nesta concentração sugere uma associação com a danificação genômica evidenciada nos espécimes de *D. melanogaster*, nos seus primeiros estágios de desenvolvimento, em função da provável letalidade causada pela mesma.

A exposição crônica à prodigiosina, como a empregada neste estudo, também pode contribuir para a mortalidade e à resistência à droga (Patil et al, 2011). Portanto, da mesma forma que a mortalidade possa ter levado às similaridades (valores de p sem diferença estatisticamente significantes – tabela 2) do ID e FD de alguns tratamentos empregados (5 $\mu\text{M/mL}$ e 10 $\mu\text{M/mL}$) em relação ao grupo controle, a presença de indivíduos mais resistentes pode ter contribuído para os resultados observados. Esse feito de resistência também pode ser atribuído às menores médias relativas observadas para o ID e o FD dos tratamentos 5 $\mu\text{M/mL}$ e 10 $\mu\text{M/mL}$ em comparação à média do tratamento 2 $\mu\text{M/mL}$ (tabela 1).

Vários estudos têm demonstrado a ação seletiva da prodigiosina (Montaner e Pérez-Tomás, 2001; Pandey et al, 2009; Pérez-Tomás e Viñas 2010; Chang et al, 2011), com seus efeitos sendo direcionados para as células tumorais.

Quanto aos efeitos genotóxicos da prodigiosina, Guryano e colaboradores (2013) não encontraram ação genotóxica significativa da droga em células sanguíneas de camundongos (teste do Micronúcleo) e em cepas de *S. typhimurium* (teste Ames).

Os dados acima citados se contrapõem aos resultados obtidos na presente investigação experimental, sugerindo que cautela deva ser empregada na utilização da prodigiosina para fins terapêuticos. Isto se deve às diferentes respostas célula-específicas ao estímulo da prodigiosina (Lu et al, 2012), da história evolutiva dos sistemas de reparo nos diferentes organismos que levaram à variação intraespecífica e interespecífica dos mesmos (Aravind et al, 1998; Kumar et al, 2013; Kienzler et al, 2013), bem como o estágio de desenvolvimento do organismo (Patil et al, 2011).

Assim, as evidências dos efeitos genotóxicos observados nos hemócitos de *D. melanogaster*, aqui demonstrados, sugerem a necessidade de maiores investigações sobre os reais efeitos da prodigiosina em células normais, para melhor assegurar a eficiência seletiva desta droga como um agente antitumoral.

Tabela 1. Evidência de danificação genômica em larvas de *D. melanogaster* após 11 dias de exposição a diferentes concentrações de prodigiosina (2; 5 e 10 μM / mL).

Concentração (μM / mL)	Níveis de Danificação					Índice e frequência de danificação genômica	
	Dano 0	Dano 1	Dano 2	Dano 3	Dano 4	*ID	**FD%
Controle	469	22	9	0	0	40	31
Controle	460	17	18	5	0	68	40
Controle	463	34	3	0	0	40	37
Média	464	24,33	10,0	1,67	0,0	49,33	26,0
2	364	56	27	36	17	286	136
2	344	146	35	47	18	339	156
2	251	104	67	63	15	487	249
Média	319,67	102,0	43,0	48,67	16,67	370,67	180,33
5	397	37	38	24	4	201	103
5	438	16	26	19	1	129	62
5	418	10	31	30	11	206	82
Média	417,67	21,0	31,67	24,33	5,33	178,67	82,33
10	414	14	32	35	5	203	86
10	357	12	31	70	30	404	143
10	344	20	61	60	15	382	156
Média	371,67	15,33	41,33	55,0	16,67	329,67	128,33

*ID (Índice de dano) **FD% (Frequência de dano).

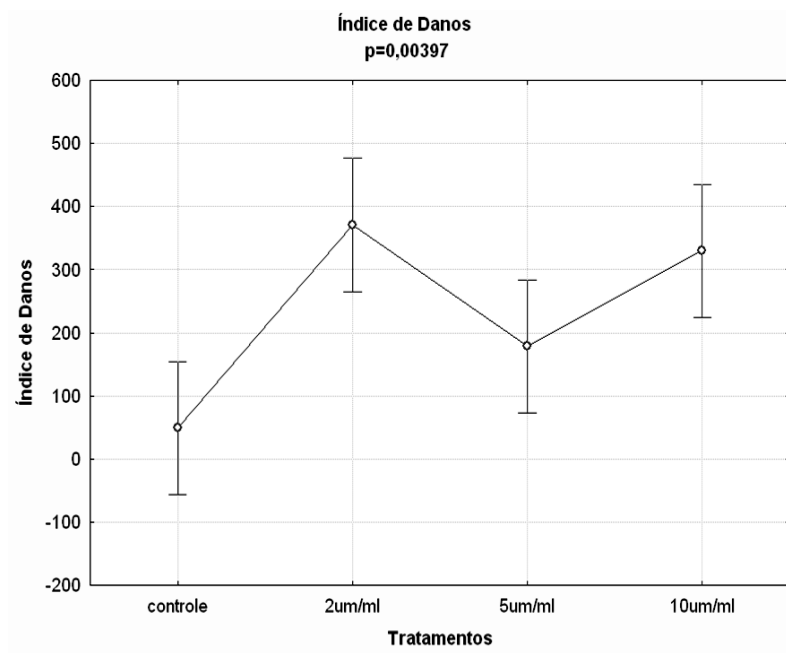


Figura 1. Gráfico da análise comparativa (ANOVA) dos Índices de Danos entre os tratamentos com 2; 5 e 10 µM/ mL de prodigiosina e o grupo controle, observados em hemócitos de *D. melanogaster*. Nível de significância 0,05.

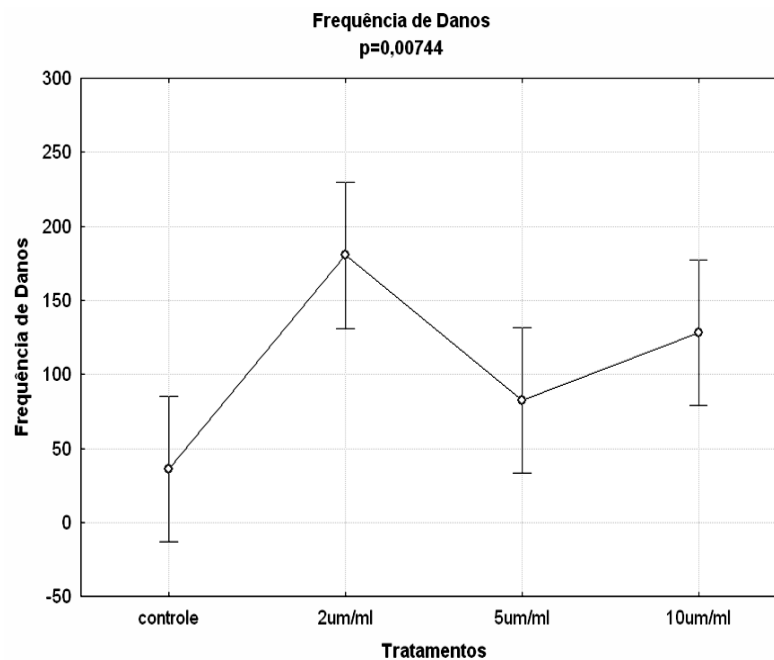


Figura 2. Gráfico da análise comparativa (ANOVA) dos Frequência de Danos entre os tratamentos com 2; 5 e 10 µM/ mL de prodigiosina e o grupo controle, observados em hemócitos de *D. melanogaster*. Nível de significância 0,05.

Tabela 2. Valores de *p* obtidos pela análise *a posteriori* de Tukey para o Índice de Danos e a Frequência de Danos mediante à exposição de hemócitos de *D. melanogaster* a diferentes concentrações de prodigiosina (2; 5 e 10 µM/ mL).

Índice de Danos					Frequência de Danos				
Tratamentos					Tratamentos				
(µM/ mL)					(µM/ mL)				
0*	2	5	10		0*	2	5	10	
0*	-	0,0049**	0,2648	0,0109**	0*	-	0,0062**	0,4621	0,0612
2	0,0049**	-	0,0697	0,9184	2	0,0062**	-	0,0470**	0,3728
5	0,2648	0,0697	-	0,1692	5	0,4621	0,0470**	-	0,4677
10	0,0109**	0,9184	0,1692	-	10	0,0612	0,3728	0,4677	-

* Grupo controle **Valores Significativos; Nível de Significância 0,05

Conclusão

A prodigiosina apresentou um forte efeito genotóxico induzindo danificação direta ao DNA nuclear de *Drosophila melanogaster* e ainda, interferindo no ciclo biológico celular produzindo retardos do desenvolvimento larval. Assim, as evidências dos efeitos genotóxicos observados nos hemócitos de *D. melanogaster*, aqui demonstrados, sugerem a necessidade de maiores investigações sobre os reais efeitos da prodigiosina em células normais, para melhor assegurar a eficiência seletiva desta droga como um agente antitumoral.

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração do Técnico de Laboratório Rafael, a Universidade Federal de Pernambuco, bem como as agências financiadoras CAPES, FACEP e CNPQ.

Referências

- Campás C, Dalmau M, Montaner B, Barragán M, Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Pérez-Tomás and Gil J. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003. 17, 746-750.
- Freire-Maia, N., & Pavan, C. (1949). Introdução ao estudo da drosófila. *Cultus*, 1(5), 1-71.
- Genes C, Baquero E, Echeverri F, D Maya J e Triana O. (2011). Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas diseases. *Genes et al. Parasites & Vectors*, 4:66
- Guryanov I.D, Karamova N.S, Yusupova O.I, Gnezdilov and Koshkaranova L.A. Bacterial Pigment Prodigiosin and Its Genotoxic Effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2013. 39, 121-128.
- Lu, C. H., Lin, S. C., Yang, S. Y., Pan, M. Y., Lin, Y. W., Hsu, C. Y., & Chang, C. C. (2012). Prodigiosin-induced cytotoxicity involves RAD51 down-regulation through the JNK and p38 MAPK pathways in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology letters*, 212(1), 83-89.
- Montaner, B., Castillo-Ávila, W., Martinell, M., Öllinger, R., Aymami, J., Giralt, E., & Pérez-Tomás, R. (2005). DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicological Sciences*, 85(2), 870-879.
- Moraes, A. M., Jorge, S. A., Astray, R. M., Suazo, C. A., Calderon Riquelme, C. E., Augusto, E. F., & Pereira, C. A. (2012). *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. *Biotechnology advances*, 30(3), 613-628.
- Pérez-Tomáz, Ricardo et al. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochemical pharmacology*. 2003. v. 66, n. 8, p. 1447-1452
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for the quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988. 175:184-191.
- Sikorowski, P. P., Lawrence, A. M., & Inglis, G. D. (2001). Effects of *Serratia marcescens* on rearing of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *American Entomologist*, 47(1), 51-60.

Strickberger, M. W. (1962). Experiments in genetics with *Drosophila*. *Experiments in genetics with Drosophila*.

Rahul, S., Chandrashekhar, P., Hemant, B., Chandrakant, N., Laxmikanth, S., & Satish, P. (2014). Nematicidal activity of microbial pigment from *Serratia marcescens*. *Natural product research*, (ahead-of-print), 1-6.

Ui, K., Ueda, R., & Miyake, T. (1989). In vitro culture of cells from dissociated imaginal disks of *Drosophila melanogaster*.

Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.

Pandey R, Chander R, Sainis KB (2009). Prodigiosins as anti-cancer agents: living upto their name. *Curr Pharm Des* 15: 732–741.

Pérez-Tomás R, Viñas M (2010). New insights on the antitumoral properties of prodiginines. *Curr Med Chem* 17: 2222–2231.

Hsieh HY, Shieh JJ, Chen CJ, Pan MY, Yang SY, Lin SC, Chang JS, Lee AYL, Chang CC. 2012. Prodigiosin down-regulates SKP2 to induce p27KIP1 stabilization and antiproliferation in human lung adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 166:2095–2108.

Lee YCG, Langley CH, Begun DJ. 2013. Differential Strengths of Positive Selection Revealed by Hitchhiking Effects at Small Physical Scales in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*, available on line.

Lavington E, Cogni R, Kuczynski C, Koury S, Behrman EL, O'Brien KR, Schmid PS, Eanes WF. 2014. A small system – high resolution study of metabolic adaptation in the Central metabolic pathway to temperate climates in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*. available online.

Campos JL, Halligan DL, Haddrill PR, Charlesworth B. 2014. The relation between recombination rate and patterns of molecular evolution and variation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*, available online.

Singh ND, Stone EA, Aquadro CF, Clark AG. 2013. Fine-Scale Heterogeneity in Crossover Rate in the *garnet-scalloped* Region of the *Drosophila melanogaster* X Chromosome. *Genetics*, 194:375-387.

Palchaudhuri R, Hergenrother PJ. 2007. DNA as target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:487-503.

Soto-Cerrato V, Llagostera E, Montaner B, Scheffer GL, Perez-Tomas R. 2004. The novel anticancer agent prodigiosin triggers mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol*, 68:1345–1352.

- Yamamoto D, Kiyozuka Y, Uemura Y, Yamamoto C, Takemoto H, Hirata H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A. 2000. Cycloprodigiosin hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 126:191–197.
- Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27:247-254.
- Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunke RB. 2011a. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*, 109(4): 1179-1187.
- Montaner B, Pérez-Tomás R. 2001. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sciences*, 68:2025-2036.
- Chang CC, Chen WC, Ho TF, Wu HS, Wei YH. 2011. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111:501–511.
- Aravind L, Walker DR, Koonin EV. 1998. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Research*, 27(5):1223-1242.
- Kumar A, Prameela TP, Suseelabhai R. 2013. A unique DNA repair and recombination gene (*recN*) sequence for identification and intraspecific molecular typing of bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and its comparative analysis with ribosomal DNA sequences. *Journal of Biosciences*, 38(2):267-278.
- Kienzler A, Bony S, Devaux A. 2013. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. *Aquatic Toxicology*, 134-135:47-56.

Danificação Genômica em *Drosophila melanogaster* decorrentes da exposição a diferentes concentrações de prodigiosina, um inseticida natural.

Lima, C.D.S¹; Verçosa, C. J¹; Lapenda, J.C.L²; Rohde, C¹; Adam, M.L³

1. Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente – Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.
2. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.
3. Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental – Universidade Federal de Pernambuco – Brasil.

O artigo foi submetido a revista *Molecular and Biochemistry*.

Autor para correspondência

² Jeanne Cristina Lapenda Lins, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil. Email: jeannecantalice@gmail.com.

Danificação Genômica em *Drosophila melanogaster* decorrentes da exposição a diferentes concentrações de prodigiosina, um inseticida natural.

Lima, C.D.S¹; Verçosa, C. J¹; Lapenda, J.C.L²; Rohd, C¹; Adam, M.L³

1. Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente – Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.

2. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.

3. Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental – Universidade Federal de Pernambuco – Brasil.

Resumo

A crescente preocupação com a saúde e meio ambiente tem estimulado as pesquisas relativas a métodos alternativos do controle de pragas e doenças. Desde o século passado, a produção de pesticidas tem crescido exponencialmente ano a ano. Os riscos da utilização indiscriminada desses produtos não se limitam à saúde humana, mas atingem também os mananciais de água, o solo, o ar e outros organismos, podendo se dispersar no ambiente e se acumular nos organismos, causando danos imediatos e em longo prazo. Visando criar estratégias alternativas ao uso de inseticidas, muitos produtos naturais de origem microbiana já vem sendo empregado como controle biológico de pragas pelo efetivo potencial de ação e pela baixa toxicidade ao meio ambiente. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação inseticida da prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* UFPEDA 398 frente a *Drosophila melanogaster*. Inicialmente, foram realizados cultivo das *D. melanogaster in vitro* onde em frascos contendo meio de cultura celular suplementado com farinha de milho de centeio e a prodigiosina (2, 5 e 10 µM/ mL) e em seguida incubados a 30 °C por 11 dias. Após este período obtiveram-se as larvas de *D. melanogaster* onde estas foram quantificadas e em seguida tiveram as hemolinfas extraídas para análises de genotoxicidade dos hemócitos. Para a avaliação da genotoxicidade da prodigiosina foi empregado o ensaio cometa (*Comet Assay*). Foi observado efeito genotóxico para a prodigiosina com base nos achados para o índice de dano (ID) e frequência de dano (FD). A comparação entre os tratamentos 2µM/mL, 5µM/mL e 10µM/mL para o ID não apresentaram diferenças significativas. Porém, a mesma comparação estabelecida para FD mostrou diferenças significativas entre os tratamentos 2µM/mL e 5µM/mL. Foi observada uma mortalidade diferencial larval no tratamento 5 µM/mL em relação aos demais. Foi observado um atraso no desenvolvimento larval em relação ao grupo controle, sendo alcançado o terceiro estágio larval cerca de 72h após o grupo controle ter alcançado o mesmo estágio. Neste sentido, com base nos dados obtidos, a prodigiosina apresentou ação genotóxica as larvas de *D. melanogaster* sendo evidenciado efeito retardatório do desenvolvimento larval, o que demonstra o potencial de ação tóxico da prodigiosina e sugerindo em estudos futuros uma melhor elucidação dos mecanismos tóxicos a indução da expressão genética nos organismos a fim de otimizar o seu potencial de ação.

Palavras-Chave: Genotoxicidade. Prodigiosina. *Drosophila melanogaster*

Introdução

A crescente preocupação com a saúde e meio ambiente tem estimulado as pesquisas relativas a métodos alternativos do controle de pragas e doenças (Asano et al, 1999; Patil et al, 2011a, 2013).

O surgimento do primeiro pesticida sintético ocorreu em 1874, o *Bis(4-chlorophenol)-1,1,1-trichloroethane* (DDT), o qual era utilizado no controle de pragas na agricultura e vetores de doenças. Atualmente, o DDT, apesar da sua alta toxicidade e persistência no ambiente, ainda é aplicado na erradicação da malária (Duarte, 2002; Goodrick, 2014). Assim, desde o século passado, a produção de pesticidas tem crescido exponencialmente ano a ano (Galli, 2006).

Os riscos da utilização indiscriminada desses produtos não se limitam à saúde humana, mas atingem também os mananciais de água, o solo, o ar e outros organismos, podendo se dispersar no ambiente e se acumular nos organismos, causando danos imediatos e em longo prazo (Sugeng et al, 2013; Androutsopoulos et al, 2013; Bhandari, 2014; Cassal et al, 2014; Seth, 2014; Mehrpour et al, 2014; Zhan e Zhang, 2014).

Muitos desses pesticidas têm sido retirados do mercado por razões econômicas devido à maior pressão seletiva causada e o desenvolvimento de resistência mais rapidamente que os demais produtos (Kaufman et al, 2011), forçando a industrialização de novos compostos (Duarte, 2002).

Como alternativa ao uso de pesticidas sintéticos, pesquisadores têm buscado produtos naturais que sejam biodegradáveis, com alta compatibilidade ao ambiente, com alta diversidade química e que ofereçam potencial para várias aplicações (Patil et al, 2011a, 2012; Venil et al, 2013). Neste contexto, com relação à saúde pública e ambiental, grandes esforços têm sido despendidos na detecção de produtos naturais que possam ser utilizados contra insetos vetores e pragas (Amer e Mehlborn, 2006). Entre tais produtos se encontram as substâncias resultantes

de microrganismos que, por serem mais seletivas que os inseticidas químicos, conferem uma alternativa segura e ecologicamente adequada para o controle biológico de pragas e vetores (Abdel-Baky e Abdel-Salam, 2003). Tais produtos microbianos atuam interrompendo o mecanismo de transmissão de doenças e disseminação de pragas através da morte dos insetos no nível de comunidade (Patil et al, 2011b).

O gênero *Serratia* possui muitas espécies (Holt et al, 1994). Várias linhagens de *Serratia* têm mostrado efeitos letais para alguns insetos quando ingeridas em altas doses, mas, em alguns casos, as linhagens podem ser altamente virulentas em baixas doses, causando a morte larval em 2-3 dias com sintomas similares a uma infecção viral (Steinhaus, 1959; Sikorowski et al, 2001; Lysyk et al, 2002). Tais linhagens são capazes de produzir a prodigiosina (5[(3- methoxy-5- pyrrol -2- ylidene) methyl] -2- methyl -3- pentyl – 1Hpyrrole), um pigmento vermelho, que se constitui de um alcalóide metabólico secundário, insolúvel em água (Patil et al, 2011a).

Serratia marcescens é um entomopatógeno oportunista e persistente no canal alimentar de insetos capaz de sintetizar a prodigiosina (Inglis e Lawrence, 2001). Essa substância pode produzir efeitos letais e subletais nos insetos, bem como reduzir a longevidade do adulto e mortalidade larval (Patil et al, 2011a, 2011b, Liang et al, 2013).

Além da atividade inseticida, a prodigiosina apresenta característica antibacteriana, antimicótica, imunomoduladora, antimalárica e antitumoral (Frustner, 2003; Pérez-Tomás e Viñas, 2010; Lu et al, 2012), além de sua utilidade na coloração têxtil (Venil et al, 2013).

O mecanismo de ação da prodigiosina tem recebido considerável atenção como um indutor de apoptose (Campás et al, 2003; Pérez-Tomás e Viñas, 2010; Patil et al, 2011a). Essa indução apoptótica pode ser mediada por uma série de ações celulares, tais como a acidificação intracelular, danificação genômica, modulação da transdução de sinais e a interrupção do ciclo celular (Pérez-Tomás e Viñas, 2010). A morte celular que se segue à danificação genômica não

é meramente uma consequência da inativação do genoma, mas sim da ativação de complexas reações enzimáticas induzidas pela instabilidade genômica, que podem levar à apoptose, necrose, autofagia e outras formas de morte celular (Roos e Kaina, 2006). Embora as células possam se adaptar a baixos níveis de danos irreparáveis no genoma, uma única quebra na dupla fita de DNA pode ser suficiente para matar a célula, se a quebra inativar genes essenciais ou de indução da apoptose (Khanna e Jackson, 2001).

Tendo em vista os mecanismos acima citados, e pelo fato de que danos no genoma correspondem a uma ameaça constante à fidelidade da transmissão das informações genéticas à prole, bem como à sobrevivência de indivíduos (Ciccia e Elledge, 2010), o presente estudo objetivou quantificar os danos no DNA de *Drosophila melanogaster*, decorrentes da exposição a diferentes concentrações de prodigiosina. Desta maneira, os resultados obtidos poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos de ação da prodigiosina, no que diz respeito à sua ação inseticida.

Material e Métodos

Obtenção da prodigiosina

A prodigiosina, produzida pela linhagem bacteriana *Serratia marcescens* UFPEDA 398, foi gentilmente cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Cultivo in vitro de Drosophila melanogaster

Os espécimes de *Drosophila melanogaster* foram cultivadas segundo o método descrito por Ui e colaboradores (1989) e Moraes e colaboradores (2012). *Drosophila* adultas de ambos os sexos foram mantidas em laboratório, em frascos de vidro, contendo meio de cultura (25 g

farinha de milho, 10 g farinha de centeio, 5 g ágar, 500 mL água destilada, 1 g nipagim dissolvido em álcool, 50 g fermento biológico e 50 g de açúcar) e a prodigiosina nas concentrações 2, 5 e 10 μM / mL. Cada frasco recebeu a quantidade 15 mL de meio e 0,4 mL da substância teste. Os frascos foram mantidos a temperatura ambiente (30 °C).

Após onze dias de exposição do adulto ao meio, foi realizada a coleta das larvas em terceiro estágio (E₃) exposição do adulto ao meio para extração da hemolinfa. Neste procedimento 60 larvas de cada frasco foram retiradas e lavadas duas vezes com água destilada. Logo após a lavagem, as mesmas foram resfriadas a 4°C por 1 minuto para a diminuição metabólica das mesmas, facilitando o seu manuseio. Seguindo o resfriamento, as larvas foram postas em placas multipoços (6 poços/placa) previamente sendo adicionada a solução de EDTA (200 mL de água destilada, 14,89 g de EDTA, 3 g de NaOH para ajuste final do pH igual a 10), para evitar a coagulação da hemolinfa. Visualizando as larvas no microscópio estereoscópico (Lupa), com a ajuda de um bisturi (Lâmina de aço de 11 mm para procedimentos cirúrgicos) e uma pinça de relojoeiro nº5 foi realizado o corte lateral na cutícula de cada indivíduo. A hemolinfa depositada no fundo da placa multipoços foi retirada com a ajuda de uma micropipeta e colocada em tubos de microcentrífuga (1,5 mL). A hemolinfa de cada conjunto de triplocata foram misturadas em um único tubo, constituindo um *pool* celular de todos os indivíduos por tratamento separadamente. A necessidade da obtenção de um *pool* celular decorreu da quantidade muito pequena de hemolinfa extraída por indivíduo. Posteriormente, os tubos foram centrifugados. O volume final de solução de EDTA mais hemolinfa foi equivalente a 0,5 mL por tubo. O mesmo foi submetido a centrifugação por duas vezes a 3000 rpm por 3 minutos, sendo descartado o sobrenadante na primeira lavagem, completando o volume com EDTA (0,5 mL) para a segunda centrifugação. Esse procedimento se fez necessário para que, após a lavagem celular, todas as impurezas fossem eliminadas, aumentando a qualidade das amostras.

Ensaio de genotoxicidade em D. melanogaster

A avaliação da danificação genômica foi realizada pelo Ensaio Cometa, segundo Singh e colaboradores (1988) com modificações. Cerca de 30 µL da suspensão celular foi homogeneizada em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*LM*) previamente aquecida em banho maria a 37 °C. Em seguida, o homogeneizado foi transferido para lâminas de vidros revestidas de agarose padrão, cobertas com lamínulas e incubadas por 15 minutos sob refrigeração a 4°C. Após este período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise por 72 horas sob refrigeração a 4°C. Transcorridas as duas horas, as lâminas foram submetidas a eletroforese (34 V por 20 minutos e a 300 mA). Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de neutralização por 15 minutos e, posteriormente, fixadas em solução de etanol absoluto por 5 minutos. Após a secagem, foram armazenadas em geladeira até o momento da coloração. Para coloração foi empregado o corante Gel Red (Biotarget GelRed®), onde 1 µL do corante foi homogeneizado em 1000 µL de água deionizada estéril (1:1000). As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Imager M2 ZEISS) realizando as contagens celulares, onde cerca de 500 células por indivíduos tratados foram analisados, sendo atribuídos escores de 0 - 4, conforme o nível de dano no nucleóide sendo nível 0 (ausência de dano, evidenciado pela preservação da morfologia nuclear, não sendo observada a formação de fragmentos nucleares e formação de calda semelhante a um cometa), 1 (Dano leve, evidenciado pela formação de fragmentos nucleares que formam uma pequena calda semelhante a de um cometa), 2 (Dano moderado, fragmentação nuclear e formação de uma significativa calda de cometa), 3 (Dano intenso, fragmentação nuclear e formação de calda bastante prolongada) e 4 (Dano intenso, intensa fragmentação nuclear, pouco conteúdo nuclear intacto e extensa calda típica de um cometa). Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas.

Análise dos dados

O Índice de Danos (ID) e a Frequência de Danos (FD) foram estabelecidos a partir da quantificação dos nucleóides em diferentes níveis de danificação para todos os tratamentos.

A homocedasticidade das amostras foi testada pelo Teste de Bartlett. A ANOVA foi estabelecida para a comparação dos resultados, sendo os mesmos confirmados pelo teste *a posteriori* de Tukey. O nível de significância empregado em todos os testes estatísticos foi 0,05.

Resultados

Foi observado efeito genotóxico para a prodigiosina com base nos achados de índice de danificação genômica (ID) e frequência de dano (FD). A homocedasticidade dos dados obtidos, tanto para o Índice de Danos quanto para Frequência de Danos, foi testada pelo teste de Bartlett. Em todos os casos, os dados apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$) sendo os dados, portanto, submetidos à comparação pela ANOVA.

Os valores do ID e FD nos diferentes tratamentos estão demonstrados na tabela 1.

A análise comparativa em relação ao grupo controle, para o ID e a FD, mostrou resultados significativos ($p < 0,05$) na análise conjunta (Figura 1 e 2).

Pelo teste *a posteriori* de Tukey, observou-se que o tratamento na concentração 5 $\mu\text{M/mL}$ não apresentou diferença significativa para ambos os parâmetros (ID e FD; $p > 0,05$) em relação ao grupo controle (tabela 2). Da mesma maneira, a comparação entre o tratamento 10 $\mu\text{M/mL}$ e o grupo controle não apresentou diferença significativa para o parâmetro FD, apesar do valor de p ($p = 0,06$) estar muito próximo do nível de significância ($p < 0,05$).

A comparação entre os tratamentos 2 μ M/mL, 5 μ M/mL e 10 μ M/mL para o ID não apresentaram diferenças significativas. Porém, a mesma comparação estabelecida para FD mostrou diferenças significativas entre os tratamentos 2 μ M/mL e 5 μ M/mL.

Foi observada uma mortalidade diferencial larval no tratamento 5 μ M/mL em relação aos demais. Porém, esse dado não foi quantificado. Também foi observado um atraso no desenvolvimento larval em relação ao grupo controle, sendo alcançado o terceiro estágio larval cerca de 72h após o grupo controle ter alcançado o mesmo estágio.

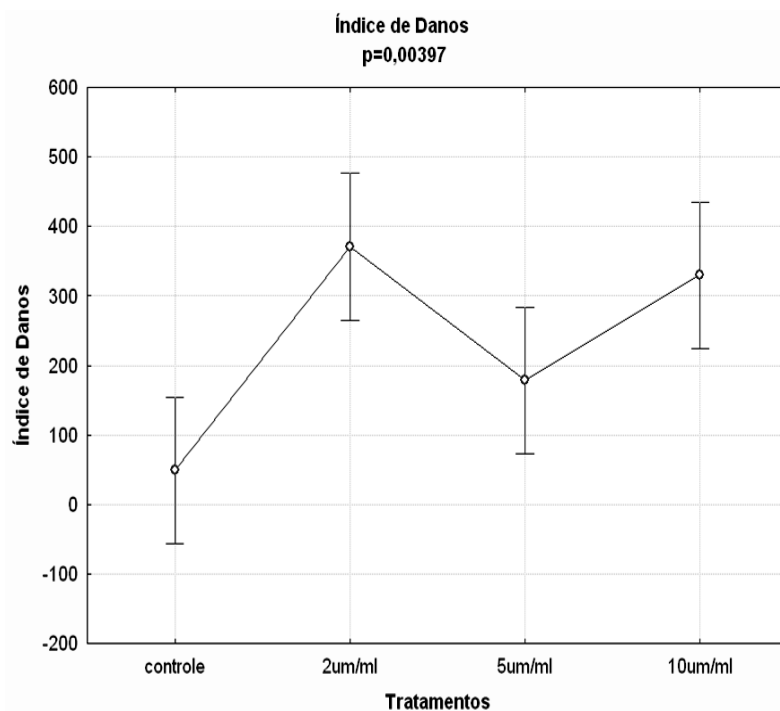


Figura 1. Gráfico da análise comparativa (ANOVA) dos Índices de Danos entre os tratamentos com 2; 5 e 10 μ M/mL de prodigiosina e o grupo controle, observados em hemócitos de *D. melanogaster*. Nível de significância 0,05.

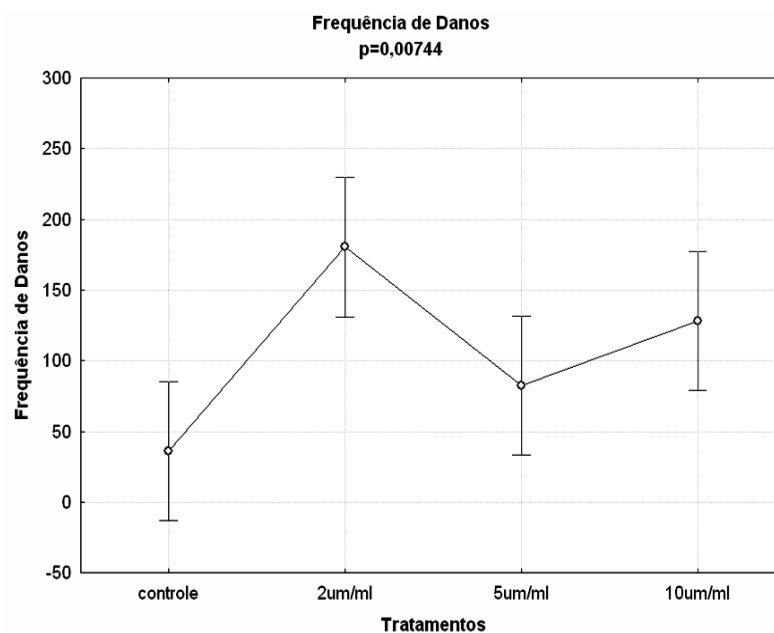


Figura 2. Gráfico da análise comparativa (ANOVA) dos Frequência de Danos entre os tratamentos com 2; 5 e 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de prodigiosina e o grupo controle, observados em hemócitos de *D. melanogaster*. Nível de significância 0,05.

Tabela 1. Evidência de danificação genômica em larvas de *D. melanogaster* após 11 dias de exposição a diferentes concentrações de prodigiosina (2; 5 e 10 μ M/ mL).

Concentração (μ M/ mL)	Níveis de Danificação					Índice e frequência de danificação genômica	
	Dano 0	Dano 1	Dano 2	Dano 3	Dano 4	*ID	**FD%
Controle	469	22	9	0	0	40	31
Controle	460	17	18	5	0	68	40
Controle	463	34	3	0	0	40	37
2	364	56	27	36	17	286	136
2	344	146	35	47	18	339	156
2	251	104	67	63	15	487	249
5	397	37	38	24	4	201	103
5	438	16	26	19	1	129	62
5	418	10	31	30	11	206	82
10	414	14	32	35	5	203	86
10	357	12	31	70	30	404	143
10	344	20	61	60	15	382	156

Tabela 2. Valores de *p* obtidos pela análise *a posteriori* de Tukey para o Índice de Danos e a Frequência de Danos mediante à exposição de hemócitos de *D. melanogaster* a diferentes concentrações de prodigiosina (2; 5 e 10 µM/ mL).

Índice de Danos					Frequência de Danos				
Tratamentos					Tratamentos				
(µM/ mL)					(µM/ mL)				
0*	2	5	10		0*	2	5	10	
0*	-	0,0049**	0,2648	0,0109**	0*	-	0,0062**	0,4621	0,0612
2	0,0049**	-	0,0697	0,9184	2	0,0062**	-	0,0470**	0,3728
5	0,2648	0,0697	-	0,1692	5	0,4621	0,0470**	-	0,4677
10	0,0109**	0,9184	0,1692	-	10	0,0612	0,3728	0,4677	-

* Grupo controle **Valores Significativos

Nível de Significância 0,05

Discussão

A previsão baseada em mecanismo e avaliação da toxicidade de drogas constitui uma ciência em evolução, cujo desenvolvimento é crítico para a descoberta de produtos com potencial para utilização em saúde e meio ambiente.

As moléculas de um determinado produto podem interagir direta ou indiretamente com proteínas, DNA, RNA e outros elementos estruturais celulares. Estes loci de interação denominados sítios de conectividade, podem interagir com outros sítios em todo o sistema.

Alguns estímulos induzidos por drogas podem apresentar efeitos generalizados no sistema, enquanto outros podem causar efeitos mais localizados. Tais estímulos se propagam na rede hierarquicamente estruturada a partir de um domínio funcional para o seguinte, até um limite crítico de perturbação funcional. A partir deste limite, perturbações na homeostase se propagam além da interação inicial, tendo como alvos moléculas celulares, organelas, células e órgãos, com o resultado final podendo ser detectado ou a ação da droga ser mensurada (Bai e Abernethy, 2013). Neste sentido, no presente estudo, a mensuração do efeito da prodigiosina em hemócitos de larvas de *D. melanogaster*, foi realizada no nível genotóxico, sendo observados efeitos de danificação genômica em todas as concentrações testadas (2 $\mu\text{M/mL}$, 5 $\mu\text{M/mL}$, 10 $\mu\text{M/mL}$, apesar das diferenças não serem significativas para alguns parâmetros em alguns tratamentos. Os resultados observados apresentaram respostas diferentes quanto à resposta genotóxica quando os parâmetros foram analisados isoladamente para cada tratamento/parâmetro (ID e FD) em relação ao grupo controle, como demonstrados pelo teste *a posteriori* de Tukey.

A proximidade do valor de *p* obtido na comparação da FD entre o grupo controle e o tratamento com 10 $\mu\text{M/mL}$ de prodigiosina, em relação ao nível de significância estabelecido, possa ser indicativo da necessidade do aumento do número amostral de hemócitos analisados, uma vez que, em relação ao ID, o mesmo tratamento apresentou nucleóides com danos em níveis 3 e 4 diferencial ao grupo controle.

Convém ressaltar que o tratamento 5 $\mu\text{M/mL}$ não apresentou uma diferença significativa em ambos os parâmetros. Porém, a mortalidade diferencial larval observada nesta concentração pode ser indicativa da sobrevivência de indivíduos mais resistentes, uma vez que os mesmos, apesar de apresentarem índices de danificação maiores (níveis de danos 2, 3 e 4), foram capazes de se manter no meio contendo a prodigiosina. Essa mesma hipótese pode ser aplicada para os menores valores relativos obtidos, tanto para o ID quanto para FD, quando comparado os

respectivos valores dos tratamentos 5 μ M/mL e 10 μ M/mL com o 2 μ M/mL. Segundo Kohanski e colaboradores (2010) e Gressel (2011), uma proporção baixa de indivíduos pode receber uma dose subletal de uma droga (por exemplo, pesticidas), serem altamente estressados pela mesma e ainda sobreviver. O estresse gerado é um aumento nas taxas de mutação. Assim, os sobreviventes que provavelmente possuem mais do que mutações normais, que incluem mutações que levam à resistência à droga, por características multifatoriais (poligênica, amplificação gênica, mutações alélicas sequenciais) e por genes de resistência. Outros pesquisadores também ressaltam o fato de que organismos com uma ótima habilidade para gerar certo nível de mutações não corrigidas, fenômeno conhecido como “*evolvability*”, apresentam uma maior chance de sobreviver às mudanças ambientais em virtude das variações estocásticas no seu genoma, que fornecem a matéria prima para a seleção natural (Aravind et al, 1999; Byrne et al, 2014).

Pesquisadores têm relatado que metabólitos secundários extraídos de muitas espécies mostram efeitos inibidores do crescimento em vários estágios de desenvolvimento em diferentes espécies de mosquito. Uma variedade de efeitos pré-emergentes podem ocorrer, tais como um atraso no desenvolvimento larval e extensão do período pupal, inibição da muda, anormalidades morfológicas e mortalidade (Zebitz, 1986; Sagar e Sehgal, 1997; Shaalan et al, 2005; Promsiri et al, 2006; Senthilkumar et al, 2009; Patil et al, 2010). Especificamente com relação à prodigiosina, Patil e colaboradores (2011) observaram que, na presença da droga, algumas larvas continuaram o seu desenvolvimento até o estágio pupal e algumas destas, posteriormente, não passaram do estágio de pupa, e ainda algumas chegaram até a fase adulta. Tais pesquisadores atribuíram esses efeitos à exposição crônica à prodigiosina. Similarmente, tais situações podem explicar tanto a mortalidade quanto o atraso do desenvolvimento observado no presente estudo, uma vez que a exposição à prodigiosina ocorreu no período de 11 dias (exposição crônica).

O conhecimento da ligação da prodigiosina ao DNA já é bem estabelecido. Esta ligação ocorre pela intercalação da molécula de prodigiosina entre os pares de base do DNA, preferencialmente entre pares de bases alternantes. Isto se deve à estrutura planar da molécula de prodigiosina. Além disso, a prodigiosina é um inibidor das DNA-topoisomerase I e II. Essa inibição ocorre devido à prodigiosina prender o complexo de clivagem DNA-enzima, resultando em quebras na dupla fita de DNA, transformando essas enzimas essenciais em agentes letais de danificação genômica (Turner e Denny, 1996; Montaner et al, 2005). Os resultados obtidos nos tratamentos demonstraram níveis aumentados de danificação genômica (relativa às quebras na molécula DNA) em relação ao grupo controle, visualizados nos diferentes níveis e frequências de danos apresentados pelos nucleóides, observados no Ensaio Cometa. Danos com níveis 3 e 4 foram observados em maior frequência nos tratamentos 2 $\mu\text{M/ml}$, 5 $\mu\text{M/ml}$ e 10 $\mu\text{M/m}$. Assim, a presença da prodigiosina nestas concentrações, no meio de cultura de *D. melanogaster*, sugere uma ação clastogênica desta droga. As consequências da clastogenia são bem conhecidas, tais como a carcinogenicidade e a perda da viabilidade celular (Lindholm et al, 2010; Lepers et al, 2014). A clastogenia também é uma das fases da apoptose. A morfologia nuclear apoptótica e os fragmentos de DNA dupla-fita oligonucleossomais (também conhecidos como *DNA ladder*) são considerados a assinatura da morte celular apoptótica (Iglesias-Guimaraes et al, 2013a, 2013b).

Assim, os prováveis efeitos clastogênicos observados neste estudo, desencadeados pela ação da prodigiosina, podem contribuir sobremaneira para o efeito inseticida desta droga.

Conclusões

A prodigiosina apresentou ação genotóxica as larvas de *D. melanogaster* em todas as concentrações de prodigiosina testadas sendo, inclusive, evidenciado efeito retardatório do

desenvolvimento larval, o que demonstra o potencial de ação tóxico da prodigiosina e sugere em estudos futuros uma melhor elucidação dos mecanismos tóxicos deste composto e a compreensão da indução da expressão genética nos organismos a fim de otimizar o seu potencial de ação.

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe técnica responsável, a Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio físico e estrutural, cedendo seus laboratórios para realização dos ensaios e aos órgãos de fomento de fundamental importância como CNPq e CAPES.

Referências

- Abdel-baky NF, Abdel-Salam AH. 2003. Natural incidence of *Cladosporium* spp. as a biocontrol agent against whiteflies and aphids in Egypt. J Appl Entomol, 127:228–235.
- Androutsopoulos VP, Hernandez AF, Liesivuori J, Tsatsakis AM. 2013. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. Toxicology, 307:89-94.
- Amer A, Mehlhorn. 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). Parasitol Res, 99:466–472.
- Aravind L, Walker DR, Koonin EV. 1999. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. Nucleic Acids Research, 27(5):1223–1242.
- Asano S, Ogiwara K, Nakagawa Y, Suzuki K, Hori H, Watanabe T. 1999. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* enhances the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin (Cry1C) against Common Cutworm, *Spodoptera litura*. J Pesticide Sci, 24:381-385.
- Bai JPF, Abernethy DR. 2013. Systems Pharmacology to Predict Drug Toxicity: Integration Across Levels of Biological Organization. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 53:451–73.
- Bhandari G. 2014. An overview of agrochemicals and their effects on environment in Nepal. Applied Ecology and Environmental Sciences, 2(2):266-273.

Byrne RT, Klingele AJ, Cabot EL, Schackwitz WS, Martin JA, Martin J, Wang Z, Wood EA, Pennacchio C, Pennacchio LA, Perna NT, Battista JR, Cox MM. 2014. eLife, 3:e01322.

Cassal VB, Azevedo LF, Ferreira RP, Silva DG, Simão RS. 2014. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Digital, 18(1):437-445.

Campàs C, Dalmau M, Montaner B, Barragán M, Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Pérez-Tomás R, Gil J. 2003. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, 17:746–750.

Ciccia A, Elledge SJ. 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. Molecular Cell, 40(2):179-204.

Duarte MAI. Poluentes Orgânicos Persistentes. Rio de Janeiro, 2002. 40p. Monografia (Especialização) Escola Politécnica da Universidade do Brasil, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Frustner A. 2003. Chemistry and biology of roseopniun and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years. Angew Chem Int Ed Engl, 42:3582–3603.

Galli A, Souza DD, Farbellini GS, Coutinho CFB, Mazo LH, Avaca LA, Machado SAS. 2006. Utilização de Técnicas Eletroanalíticas de pesticidas em alimentos. Química Nova, 29(1):105-112.

Goodrick S. 2014. Plague and pesticides. The Lancet Neurology, 13(3):244.

Gressel J. 2011. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. Pest Management Science, 67(3):253-257.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. Determinatively anaerobic gram-negative rods. In Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, pp. 175–289.

Inglis GD, Lawrence AM. 2001. Effects of *Serratia marcescens* on the F1 generation of laboratory-reared *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). J Econ Entomol, 94:362–366.

Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Sánchez-Osuna M, Casanelles E, Garcia-Belinchón M, Comella JX, Yuste VJ. 2013a. Chromatin Collapse during Caspase-dependent Apoptotic Cell Death Requires DNA Fragmentation Factor, 40-kDa Subunit-/Caspase-activated Deoxyribonuclease-mediated 3'-OH Single-strand DNA Breaks. The Journal of Biological Chemistry, 288(13):9200-9215.<http://www.jbc.org/content/288/13/9200.full-fn-3>

Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Sánchez-Osuna M, Casanelles E, Garcia-Belinchón M, Comella JX, Yuste VJ. 2013b. Chromatin collapse during caspase-dependent apoptotic cell death requires DFF40/CAD- mediated-3'OH-single-strand DNA breaks. The Journal of Biological Chemistry, available on line.

- Kaufman PE, Mann RS, Butler JF. 2011. Insecticidal potency of novel compounds on multiple insect species of medical and veterinary importance. *Pest Manag Sci*, 67:26–35.
- Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27:247-254.
- Lepers C, Dergham M, Armand L, Billet S, Verdin A, Andre V, Pottier D, Courcot D, Shirali P, Sichel F. 2014. Mutagenicity and clastogenicity of active airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. *Toxicology in Vitro*, 28(5):866-874.
- Liang TW, Chen SY, Chern Y, Chen CH, Yen YH, Wang SL. 2013. Enhancement of Prodigiosin Production by *Serratia marcescens* TKU011 and Its Insecticidal Activity Relative to Food Colorants. *Journal of Food Science*, 78(11):1743-1751.
- Lindholm C, Acheva A, Salomaa S. 2010. Clastogenesis plasma factors: a short overview. *Radiation and Environmental Biophysics*, 49(2):133-138.
- Lysyk TJ, Kalischuk-Tymensen LD, Selinger LB. 2002. Comparison of selected growth media for culturing *Serratia marcescens*, *Aeromonas* sp., and *Pseudomonas aeruginosa* as pathogens of adult *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol*, 39:89–98.
- Mehrpour O, Karrari P, Zamani N, Tsatsakis AM, Abdollani M. 2014. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicology Letters*, Available on line 24 January 2014.
- Montaner B, Castillo-Ávila W, Martinell M, Ollinger R, Aymami J, Giralt E, Pérez-Tomás R. 2005. DNA Interaction and Dual Topoisomerase I and II Inhibition Properties of the Anti-Tumor Drug Prodigiosin. *Toxicological Sciences*, 85:870-879.
- Moraes AM, Jorge SA, Astray RM, Suazo CA, Calderon Riquelme CE, Augusto EF, Pereira CA. 2012. *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. *Biotechnology advances*, 30(3): 613-628.
- Patil SV, Patil CD, Salunke BK, Salunkhe RB. 2010. Larvicidal efficacy of six plants against two mosquito species *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Trop Biomed*, 27(3):360–365.
- Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB. 2011a. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*, 109(4): 1179-1187.
- Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB. 2011b. Bioefficacy of *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae) and *Cestrum nocturnum* (Solanaceae) plant extracts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and nontarget fish *Poecilia reticulata*. *Parasitol Res*, 108(5):1253–1263.
- Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB. 2012. Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species

Aedes aegypti, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. Parasitology Research, 110(5): 1841-1847.

Pérez-Tomás R, Viñas M. 2010. New insights on the antitumoral properties of prodigiosines. Current Medicinal Chemistry, 17(1):2222-2231(10).

Promsiri S, Naksathit A, Kruatrachue M, Thavara U. 2006. Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culcidae) and other effects on a non target fish. Insect Sci, 13:179–188.

Roos WP, Kaina B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. TRENDS in Molecular Medicine, 12(9):440-450.

Sagar SK, Sehgal SS. 1997. Toxicity of neem seed coat extract against mosquitoes. Indian Journal of Entomology. 59(2):215-223.

Seth PK. 2014. Chemical contaminants in water and associated health hazards. Water and Health, 375-384.

Shaalan EAS, Canyonb D, Younesc MWF, Abdel-Wahaba H, Mansoura AH. 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environ Int, 31:1149–1166.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for the quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, 175:184-191.

Sikorowski PP, Lawrence AM, Inglis GD. 2001 Effects of *Serratia marcescens* on rearing of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). Am Entomol, 47:51–60.

Steinhaus EA. 1959. *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. Hilgardia, 28:351–380.

Suseng AJ, Beamer PI, Lutz EA, Rosales CB. 2013. Hazard-ranking of agricultural pesticides for chronic health effects in Yuma Country Arizona. Science of the Total Environment, 463-464:35-41.

Turner PR, Denny WA. 1996. The mutagenic properties of DNA minor-groove binding ligands. Mutat Res, 355:141–169.

Ui K, Ueda R, Miyake T. 1989. In vitro culture of cells from dissociated imaginal disks of *Drosophila melanogaster*. AGRIS, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. 2013. Bacterial pigments and their applications. Process Biochemistry, 48(7):1065-1079.

Zhan Y, Zahang M. 2014. Spatial and temporal patterns of pesticides use on California almonds and associated risks to surrounding environment. Science Of Total Environment, 472:517-529.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICAS E EFEITOS GENOTÓXICOS DA PRODIGIOSINA PRODUZIDA POR *Serratia marcescens*.

Pesquisador: Jeanne Cristina Lapenda Lins

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18177413.4.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 359.835

Data da Relatoria: 14/08/2013

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

Recomendação:

Incluir na metodologia do Projeto de Pesquisa (PBrasil), a forma do cálculo da amostra, conforme indicado no Projeto de Doutorado item 5.7.1;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com recomendação.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Continuação do Parecer: 359.835

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, através da PLATAFORMA BRASIL.

RECIFE, 14 de Agosto de 2013

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



HOME LOGOUT HELP REGISTER UPDATE MY INFORMATION JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU CONTACT US SUBMIT A MANUSCRIPT INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

R

Submissions Being Processed for Author Jeanne Lapenda Cantalice, M.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

 Action 	Manuscript Number 	Title 
View Submission View Reference Checking Results Correspondence Send E-mail	WIBI-D-14-00615	Antimicrobial activity of prodigio 398.

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

<< Author Main Menu



World Journal of Microbiology and Biotechnology

Editor-in-Chief: Peter J. **Large**

ISSN: 0959-3993 (print version)

ISSN: 1573-0972 (electronic version)

Journal no. 11274

Instructions for Authors

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

FORMAT

Manuscripts should be divided into the following sections:

- Title page
- Abstract
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion; the Discussion section must not recapitulate the Results
- Acknowledgements
- References
- Figure legends
- Figures
- Tables

Results and Discussion should be separated.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics.* Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure.* Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

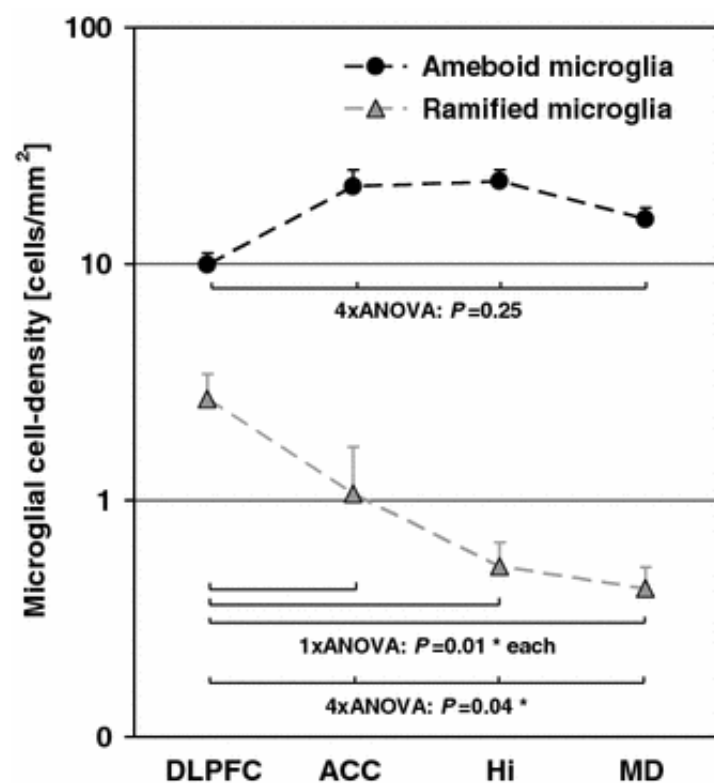
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Jeanne Cantalice <jeannecantalice@gmail.com>

Your Submission CYTO-D-14-00051R3

5 mensagens

Cytotechnology (CYTO) <no-reply@editorialmanager.com>

29 de julho de 2014 18:15

Responder a: "Cytotechnology (CYTO)" <renuka.nidhi@springer.com>

Para: Jeanne Cristina Lapenda <jeannecantalice@gmail.com>

Dear Dra Jeanne Cristina Lapenda,

We have received the reports from our advisors on your manuscript, "Evidence of genomic damage induced by prodigiosin in normal human mononuclear cells.", submitted to Cytotechnology

Based on the advice received, I have decided that your manuscript can be accepted for publication after you have carried out the corrections as suggested by the reviewer(s).

Attached, please find the reviewers' comments for your perusal.

PLEASE CHECK ONLINE FOR POSSIBLE (REVIEWER) ATTACHMENTS!

Please submit your revised manuscript online by using the Editorial Manager system which can be accessed at:

<http://cyto.edmgr.com/>

Your username is: Cantalice

Your password is: lapenda46284

I am looking forward to receiving your revised manuscript before 30 Sep 2014

With kind regards,
Otto Merten
Editor in Chief

Comments for the Author:

Comments from the authors:

Many thanks for the resubmission of your manuscript, however, before acceptance there are still many corrections and modifications to be done:

- page 4, line 17: what was the concentration of phytohemagglutinine which you have used? This should be indicated. In addition, which was the provider?
- page 6: the figures should be numbered in a chronological order as they appear in the text.
- page 6, lines 7-9: more description of the results obtained should be given in the general text.
- page 6, lines 8-9: figure 4 does not present results obtained with the reagent, please, correct.
- page 6, sentence in line 23-24: this (the text in this sentence) is not seen when both figures are compared.
- page 6, last sentence: not clear, how this is confirmed and how this is shown in the figure. Please, clarify.
- page 7, general question: how is the damage index calculated? Please, describe this in the materials and methods section.
- page 7, line 4: Fig. 5 - damage index or Comet assay? please, clarify.
- page 7, line 9: Fig. 6 and 7. The message in the figures should be written in the text. Both figures are not necessary.
- page 7, line 22: 'proportionality index' - how is this calculated?
- page 7, lines 22-24: the sentence is not clear and should be rephrased.
- page 7, lines 24/25 - page 8, line 1: the sentence is not clear and should be rephrased.
- page 8, lines 4-5: the sentence is not clear and should be rephrased.
- page 8, lines 24-26: the sentence is not clear and should be rephrased.
- page 9, lines 10-15: the sentences are not clear and should be rephrased.

User Menu

[User Profile](#)[Manage E-mail Alerts](#)[Manage E-mail Newsletters](#)[Manage Saved Searches](#)[Change Password](#)[Edit Profile](#)[Logout](#)

Submissions Menu

[Submit Manuscript](#)[Display Submitted Manuscripts](#)[Help](#)

Manuscript Status

Manuscripts status

Manuscript-ID	Journal	Section / Special Issue	Title	Status	Submission Date	
molecules-57395	Molecules		Genome damage in <i>Drosophila melanogaster</i> stemming from exposure to different concentrations of prodigiosin, a natural insecticide.	Submitted	2014-05-16 19:31:39	

Submissions Being Processed for Author Jeanne Cristina Lapenda, M.D

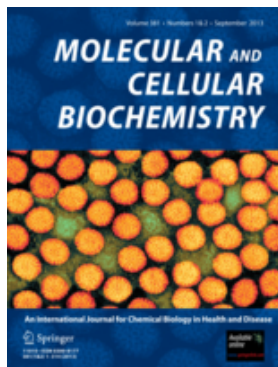
Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

 Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
Action Links		Evidence of genomic damage induced by prodigiosin in normal human mononuclear cells.	02 Mar 2014	02 Mar 2014	New Submission

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.[<< Author Main Menu](#)



Molecular and Cellular Biochemistry

An International Journal for Chemical Biology in Health and Disease

Editor: Naranjan S. **Dhalla**

ISSN: 0300-8177 (print version)

ISSN: 1573-4919 (electronic version)

Journal no. 11010

Instructions for Authors

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see