

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Luana Suéling Lenz

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DA BERBERINA EM CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA SH-SY5Y**

Santa Maria, RS
2017

Luana Suéling Lenz

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DA BERBERINA EM CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA SH-SY5Y**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^a Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade
Co-orientadora: Dr^a Micheli Mainardi Pillat

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lenz, Luana Suéling
ATIVIDADE ANTITUMORAL DA BERBERINA EM CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA SH-SY5Y / Luana Suéling Lenz.- 2017.
55 p.; 30 cm

Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade
Coorientadora: Micheli Mainardi Pillat
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2017

1. Neuroblastoma 2. Berberina I. Melazzo de Andrade,
Cinthia II. Mainardi Pillat, Micheli III. Título.

Luana Suéling Lenz

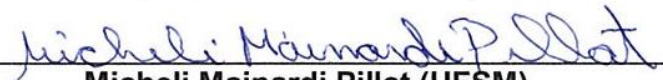
**ATIVIDADE ANTITUMORAL DA BERBERINA EM CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA SH-SY5Y**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Aprovada em 23 de fevereiro de 2017:



Cinthia Melazzo de Andrade (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Micheli Mainardi Pillat (UFSM)
(Co-orientadora)



Michele Rorato Sagrilo (UNIFRA)



Liliane Bauermann (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais Tarcisio Pedro Lenz e Lizete Nair Lenz por todo amor e carinho de sempre. Sem o apoio de vocês eu jamais conseguiria chegar a conclusão deste trabalho ou de qualquer outra conquista. Obrigada por sempre acreditarem em mim, e me dar suporte nos momentos mais difíceis. Da mesma forma sou grata ao meu irmão Émerson Andrei Lenz que me acompanha e me ajuda desde os tempos de escola, e por isso serei eternamente grata;

Ao meu namorado, Luis Felipe Dias Pereira, que viu de perto todas as maiores dificuldades encontradas ao longo da realização desse trabalho. Obrigada pelo incentivo nos momentos que eu pensei em desistir, pela paciência e por entender meus compromissos;

À minha orientadora, professora Cinthia Melazzo de Andrade, pela confiança e oportunidade de cursar o mestrado e realizar este estudo em seu laboratório;

À Micheli Mainardi Pillat, que além de desempenhar o papel de co-orientadora, se mostrou uma amiga, e me acompanhou desde o início do projeto até o fim. Por todo seu apoio, paciência e, principalmente, ensinamentos eu sempre serei grata;

Aos colegas do laboratório Bioox convivência e ajuda na realização dos experimentos;

Ao laboratório Biogenômica e seus integrantes, que acompanharam o início da minha vida acadêmica durante a iniciação científica e mantiveram as portas abertas inúmeras vezes;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pelo aprendizado e oportunidade;

À agência de fomento CAPES, responsável pelo fornecimento da bolsa de estudos, que possibilitou a concretização desse trabalho;

Enfim a todos àqueles que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

RESUMO

ATIVIDADE ANTITUMORAL DA BERBERINA EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

AUTORA: Luana Suéling Lenz
ORIENTADOR: Cinthia Melazzo De Andrade
CO-ORIENTADOR: Micheli Mainardi Pillat

Neuroblastoma é o tumor mais comum encontrado no primeiro ano de vida e representa 6% do total de cânceres infantis. Existem poucas opções de tratamento e a mortalidade chega a 21%, entre os casos de alto risco a mortalidade ultrapassa os 50%. A berberina é um alcaloide utilizado na medicina tradicional chinesa por muito tempo e diversos estudos têm comprovado atividades farmacológicas variadas desse composto, entre elas a antitumoral. Sendo assim, esta molécula pode ter potencial no tratamento do neuroblastoma. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a BBR possui ação anti-tumoral na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y, bem como, investigar seu possível mecanismo através da via das espécies reativas de oxigênio (ERO), proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e p53. Inicialmente, foi realizado um ensaio de morte celular com diferentes concentrações de BBR. A partir desses dados, identificamos a menor concentração capaz de levar as células a morte, a qual foi usada nos testes posteriores. Em células não tratadas ou tratadas com BBR e/ou um inibidor de AMPK (composto C), foi determinado os índices de apoptose e medidas do ciclo celular, bem como marcação com anticorpos específicos para quantificar a fosfo-p53 (Ser-15) e caspase 3. Paralelamente, a capacidade de migração e de formação de colônias, os níveis de ERO, atividade das enzimas antioxidantes e danos oxidativos ao DNA foram avaliados. Ainda, foi realizado q-PCR para quantificar a expressão dos genes p53, bax, bcl-2, caspase-3 e enzimas antioxidantes. Nossos resultados demonstram que a BBR não altera o ciclo celular nas células estudadas, diferente do que é encontrado descrito em outros estudos, mas provoca um aumento na quantidade de células apoptóticas e dos níveis de p-p53 independente da atividade da AMPK, além de provocar aumento das ERO e da atividade da enzima catalase. Também, houve uma redução na capacidade migratória e de formação de colônias nas células tratadas. Sugere-se com este estudo que a BBR tem potencial terapêutico como adjuvante no tratamento do neuroblastoma.

Palavras chaves: Neuroblastoma. Berberina. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

ANTIMURAL ACTIVITY OF BERBERINE ON NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELL

AUTHOR: Luana Suéling Lenz
ADVISOR: Cinthia Melazzo De Andrade
CO-ADVISOR: Micheli Mainardi Pillat

Neuroblastoma is the most common tumor found in the first year of life and represent 6% of the all childhood cancers. There is few options of treatment and the mortality is close to 21%, or exceeds 50% between the high risk cases the mortality. Berberine (BBR) is an alkaloid used in traditional Chinese medicine for a long time and several studies have proved a diversity of pharmacological activities from this compound, among them antitumoral. Therefore, this molecule may have potential to the treatment of neuroblastoma. The aim of this study was to evaluate whether BBR has antitumoral activity in SH-SY5Y neuroblastoma cell lineage, as well as, investigate if the mechanism trigger is through ERO induction, AMPK and p53 activation. First of all, it was performed a cell death assay with several different concentration of BBR. From this data, we identify the minor concentration able to lead cell to death, which was used in the next experiments. In cells treated or not with BBR and/or an AMPK inhibitor (Compound C), it was determined the apoptotic index and cell cycle measure, as well as labeling with specific antibody to quantify the phosphor-p53 and caspase 3. In the same way, the migration and forming colony ability, ERO levels, activity of antioxidant enzymes and oxidative damage on DNA was detected. Still, it was done q-PCR to quantify the expression of p53, bax, bcl-2, caspase-3 and antioxidant enzymes genes. Our results prove that BBR do not alter cell cycle in cell line studied, unlike the results from other researches, but increase the apoptotic cells and the levels of p-p53 independent of AMPK activity, besides causing an increase in ERO levels and catalase activity. Also, it was detected a decrease in migratory and forming colony ability in the cells treated. This study suggest that BBR have therapeutic potential as an adjuvant in neuroblastoma treatment.

Keywords: Berberine. Neuroblastoma. Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosina monofosfato
AMP: Adenosina Monofosfato
AMPK: Proteína quinase ativada por AMP
ATP: Adenosina Trifosfato
BBR: Berberina
BMP: Proteína morfogenética óssea
CaMKK: quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina
cDNA: DNA complementar
DCFH-DA: diclorofluoresceína diacetato
DCF: diclorofluoresceína
ERO: Espécie reativa de oxigênio
LKB1: proteína quinase B1 do fígado
mRNA: RNA mensageiro
NADP: Fosfato dinucleotido de nicotinamida e adenina
SOD: Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. CÂNCER	8
1.2. NEUROBLASTOMA	9
1.3. BERBERINA	12
1.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	14
1.5. PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR AMP	16
1.6. APOPTOSE E P53	18
1.7. JUSTIFICATIVA.....	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVOS GERAIS	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MANUSCRITO CIENTÍFICO	22
4. CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

Atualmente o Câncer é um problema de saúde pública. A estimativa para o Brasil nos anos de 2016 e 2017, feita pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, é de 600 mil novos casos.

Apesar de a palavra câncer ser utilizada popularmente como uma doença única, ela representa um conjunto de doenças com características comuns, sendo a mais importante o crescimento descontrolado de células. De fato, mesmo um único tipo de câncer, como o neuroblastoma, varia muito de um paciente para outro. A doença tem início devido a ocorrência de mutações *drivers* (STRATTON et al., 2009), que geram vantagens seletivas e provocam a transformação de células normais em cancerígenas. O crescimento descontrolado leva a formação de tumores cujas células podem desenvolver capacidade metastática e assim se espalhar pelo organismo, levando o paciente a morte (STRATTON et al., 2009).

Ao longo da progressão da doença diversas características importantes são observadas. Hanahan e Weinberg (2011) identificaram as “marcas registradas” do câncer: sustentação das vias de sinalização de proliferação, escape de supressores de crescimento, resistência a morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese, capacidade de invasão e metástase, reprogramação energética, escape do sistema imune, instabilidade genômica e inflamação.

Outra característica marcante é a composição heterogênea de fenótipos, cuja origem ainda não é completamente esclarecida, mas sabemos que a instabilidade genética, bem como a manutenção e diferenciação de células tronco tumorais, contribuem no processo (WELCH et al., 2016). Essa heterogeneidade permite a seleção de característica benéficas ao tumor, e portanto, o câncer nada mais é do que um processo evolutivo, que inicia com células com capacidade proliferativa acentuada e culmina com a seleção de, por exemplo, células com capacidade de entrar na corrente sanguínea, invadir novos tecidos e iniciar novos tumores (CASÁS-SELVES; DEGREGORI 2011).

1.2. NEUROBLASTOMA

Neuroblastoma é um tumor sólido extracraniano derivado de células imaturas do sistema nervoso simpático que geralmente aparece na região abdominal, principalmente na glândula adrenal (MULLER; MATTHAY, 2009). Por ser um tumor embrional é raramente encontrado em maiores de 15 anos de idade, entretanto é o tumor mais comum em menores de um ano. Estima-se que ele seja responsável por cerca de 15% de todas as mortes causadas por câncer em crianças (World cancer report, 2014). Embora sejam variados conforme o local do tumor, alguns sintomas que os pacientes apresentam são: dor e inchaço abdominal, dor nos ossos, hematoma ao redor do olho, ptose palpebral, anemia além de sintomas sistêmicos como febre, fraqueza e pressão alta (American Cancer Society, 2016).

Embora a maioria dos casos diagnosticados tem como sítio primário a glândula adrenal, esse tumor pode ser encontrado em qualquer local ao longo do sistema nervoso simpático, como gânglios simpáticos torácicos, cervicais ou sacrais. Isso é devido a sua origem, que se dá a partir de células da linhagem simpatoadrenal (CHEUNG; DYER, 2013), que por sua vez são derivadas de células da crista neural. Durante o desenvolvimento, as células da linhagem simpatoadrenal migram ventralmente a partir da crista neural em direção à aorta dorsal. Ao completar sua migração elas são expostas a fatores tais como BMPs (*bone morphogenetic protein*) e por consequência adquirem características neuronais e catecolaminérgicas (SHTUKMASTER et al., 2013). Essas células ainda passam por uma segunda onda migratória, que as leva até seus sítios finais, nesse processo completam sua diferenciação em células do sistema nervoso simpático e células cromafins (HUBER 2015).

Apesar da maioria dos casos de neuroblastoma ser multifatorial, também existe o neuroblastoma familiar, responsável por menos de 2% dos casos (CHEUNG; DYER, 2013). Alterações em dois genes foram descritas como sendo responsáveis, o *PHOX2B* e o *ALK*, ambos expressos nas células da linhagem simpatoadrenal. O *PHOX2B* é uma das proteínas importante na diferenciação da linhagem simpatoadrenal, uma vez que é um fator transcricional responsável por promover

diferenciação neuronal. Mutações de inativação desse gene foram as primeiras a serem descritas como tendo papel no neuroblastoma hereditário (TROCHET et al., 2004). A lesão mais comum, entretanto, são mutações de ativação no gene *ALK*. Esse gene codifica o receptor tirosina quinase do linfoma anaplásico que é responsável por promover a proliferação celular (MOSSÉ et al., 2008). Para o desenvolvimento saudável do embrião é necessário um equilíbrio entre proliferação e diferenciação da linhagem simpatoadrenal, controlado por esses dois genes, entre outros.

Mutações de ativação (cerca de 6-10%) e de ampliações (cerca de 3-4%) no *ALK* também são encontradas no neuroblastoma esporádico (CHEUNG; DYER, 2013). Várias outras alterações já foram identificadas, sendo que muitas ainda precisam ser entendidas do ponto de vista biológico e de desenvolvimento. Mutações no gene *ATRX* aparecem frequentemente em casos de neuroblastoma, além de estarem associados com a síndrome de retardo mental ligado ao X (MOLENAAR et al., 2012), o que indica uma grande importância da proteína durante o desenvolvimento. A proteína codificada por esse gene é uma helicase remodeladora de cromatina dependente de ATP (família SWI/SNF) (LAW et al., 2010). Crianças menores de 18 meses em estágio 4 da doença ainda não foram identificadas portando alterações no *ATRX*, por outro lado 44% de pacientes maiores de 12 anos tem alterações nesse gene (CHEUNG; DYER, 2013). Esses dados indicam que existe uma correlação entre mutações no *ATRX* e idade do diagnóstico. Entretanto a alteração molecular mais comum no neuroblastoma esporádico (cerca de 22% dos casos) é a amplificação de uma região do braço pequeno do cromossomo 2 (2p24) que contém o proto-oncogene *MYCN* (DAVIDOFF 2012). Essa alteração é capaz de tumorigênese em *zebrafish* e ratos, e portanto é chamada de mutação *driver* (CARTER et al., 2016; CHEUNG; DYER, 2013). *MYCN* faz parte da família *MYC*, e codifica para um fator transcricional (N-myc) que ao dimerizar com a proteína MAX, regula a transcrição de diversos genes. Sua função é manter a proliferação celular e o fenótipo indiferenciado (BELTRAN 2014; NAIR; BURLEY 2003).

Entre os casos diagnosticados, há uma grande variedade no comportamento clínico tumoral: desde regressão espontânea até progressão apesar de intenso tratamento, culminando em óbito. O neuroblastoma é o tumor maligno conhecido com maiores taxas de regressão espontânea. Hero et al. (2008), descreveram em estudo prospectivo o acompanhamento de 93 pacientes diagnosticados quando menores de

um ano de idade, e que ficaram sob observação antes de intervenção terapêutica. Desses 93 pacientes, a regressão espontânea foi vista em 44, sendo 17 regressões completas. Além disso, a taxa de incidência de neuroblastoma é maior em áreas com programas de rastreamento, o que pode ser devido a regressões tumorais espontâneas não rastreadas naqueles países que não possuem esses programas. Por outro lado, pacientes com doenças graves apresentam progressão tumoral, muitas vezes mesmo com intervenção terapêutica agressiva. O prognóstico depende de fatores:

Idade: Crianças menores de 18 meses tem maiores taxas de sobrevivência e menores riscos de recorrência. O prognóstico piora conforme aumenta a idade do paciente (MULLER; MATTHAY, 2009). Adultos diagnosticados com neuroblastoma são raros, porém geralmente a doença culmina em óbito devido ao prognóstico ruim e a falta de tratamento padrão eficiente (SMITH et al., 2013).

Alterações genéticas: a amplificação do *MYCN* é a mais frequente em tumores, e está associada com um prognóstico ruim. Está descrito que essa proteína tem múltiplos papéis no neuroblastoma, tais como indução da migração e metástase, angiogênese, proliferação e bloqueio da diferenciação (HUANG; WEISS 2013).

Histologia e grau de diferenciação tumoral: tumores com células menos diferenciadas apresentam comportamento mais agressivo.

Estagio tumoral: como para outros tumores, o prognóstico é melhor quando a doença ainda está em estágios iniciais. Antigamente era usado o *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) para determinar entre os estágios 1, 2A, 2B, 3, 4 e 4S. Esse sistema usava como critério o resultado da remoção cirúrgica do tumor. Hoje está disponível o *International Neuroblastoma Risk Group Staging System* (INRGSS) (MONCLAIR et al., 2009), sua vantagem é que ele é baseado em resultados de exames de imagens realizados antes de qualquer intervenção terapêutica. Os antigos estágios foram substituídos por estágios L1 e L2, que correspondem a tumores locais não metastáticos com ausência ou presença de fatores de risco definidos por imagem, estágio M, quando metástases distantes estão presentes, e estágio MS, quando o tumor é metastático em crianças menores de 18 meses, porém a metástase limitada a pele, fígado ou até 10% das células nucleadas na medula óssea.

Levando esses fatores em consideração e com o objetivo universalizar os critérios de risco, foi publicado o *International Neuroblastoma Risk Group* (INRG), que divide a doença em quatro grupos de risco, a ser considerados para determinação da terapia: Muito baixo, baixo, intermediário e alto (COHN et al., 2009). Nesse último, a taxa de sobrevivência livre de doença em cinco anos é menor que 50% (COHN et al., 2009). Os critérios utilizados para fazer esta estratificação são idade, amplificação de *MYCN*, histologia, grau de diferenciação tumoral, estágio tumoral, aberração 11q e ploidia celular (COHN et al., 2009; MULLER; MATTHAY, 2009).

A terapia varia conforme o grau da doença. Frequentemente, para os casos de baixo risco, a terapia de escolha é apenas a cirurgia. Por outro lado, os casos mais graves são tratados com terapias combinadas, geralmente ciclos de quimioterapia seguido por cirurgia, radioterapia local, transplante de células tronco autólogas e ainda utilização do ácido *cis*-retinóico a fim de induzir a diferenciação celular (COHEN et al., 2014). Já é descrito que esses tratamentos intensivos para a doença podem causar danos tardios, tais como problema de crescimento, hipertireoidismo, falência ovariana, perda de audição e problemas dentários (COHEN et al., 2014). Sendo assim, são necessários estudos que investigam terapias com baixa toxicidade às células saudáveis, mas eficientes efeitos antitumorais contra o neuroblastoma.

1.3. BERBERINA

Os metabólitos secundários de plantas são compostos produzidos pelas mesmas cuja função não é essencial para a sobrevivência, mas que desempenham papéis importantes no *fitness* do organismo. Por exemplo, metabólitos secundários podem auxiliar na atração de polinizadores ou serem tóxicos a outros organismos, e portanto promover a defesa da planta contra herbívoros ou patógenos, ou mesmo contra plantas competidoras (SCHÄFER; WINK, 2009). Muitos deles são de interesse medicinal e por isso são amplamente estudados. Vários medicamentos já usados na medicina são metabólitos secundários, exemplo disso é L-DOPA, morfina, codeína, vimblastina e vincristina.

A Berberina (BBR) ($C_{20}H_{18}NO_4$)⁺ é um composto alcaloide isoquinolínico de coloração amarelada utilizado por séculos na medicina tradicional chinesa. Ela pode

ser isolada de raízes e caules de diversas plantas das famílias Berberidaceae, Ranunculaceae e Papaveraceae, tais como *Berberis vulgaris* (espinho vinhoso) e *Coptis chinensis* (fios de ouro) (SINGH; MAHAJAN 2013). Tem sido sugerido que a BBR tem potencial terapêutico em doenças como Alzheimer, diabetes e obesidade (JIN; KHADKA; CHO 2016). Isso se deve a suas atividades farmacológicas variadas, tais como antioxidante (BHUTADA et al., 2011; SHIRWAIKAR et al., 2006), anti-inflamatória (JEONG H. W. et al., 2009) e antimicrobiana (SUN N. et al., 2014).

Recentemente, diversos estudos tem comprovado promissores efeitos antitumorais da BBR sobre linhagens celulares e modelos xenográficos. Apenas nos últimos 5 anos, foi comprovada a atividade antitumoral *in vitro* da BBR sobre células de mieloma U266 (HU et al., 2013), de melanoma de rato B16F10 (MITTAL et al., 2014), de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (XIE et al., 2015), de carcinoma epidermóide oral KB (KIM et al., 2015) e de colorretal SW620 (LIU et al., 2015).

É possível que essa molécula desempenhe atividade antitumoral por diversos mecanismos, dependendo do tipo celular, dose e tempo de tratamento. A concentração citotóxica dessa molécula também varia bastante em diferentes linhagens celulares. Entre os efeitos já comprovados podemos citar o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HU et al., 2013), indução de apoptose (HU et al., 2013, XIE et al., 2015) e alteração do ciclo celular (HU et al., 2013).

Tem sido suposto também que os efeitos causados pela BBR são devido a sua capacidade de promover alterações pós-traducionais, como a fosforilação de proteínas, e alterar os níveis de transcrição gênica. Uma das vias pela qual a BBR pode alterar a expressão de genes é através da ligação com sequências TATA box em regiões promotoras do DNA, resultando em inibição da transcrição, além de poder ligar com a cauda poli-A de RNAm, promovendo sua estabilização e aumentando a sua meia-vida (YUAN et al., 2015).

Estudos já realizados tem sugerido que as doses citotóxicas de BBR sobre células tumorais, não o são sobre células saudáveis. Assim, Wu et al (2015) demonstraram que células miometriais imortalizadas (UtLM) são sensíveis a BBR 10 μ M enquanto células miometriais normais (UtSMC) não. Adicionalmente, Liu et al (2015) mostraram que ratos submetidos a modelo xenográfico e tratados com BBR tiveram redução do crescimento tumoral mas não tiveram as funções de fígado e rim alteradas. Mittal et

al. (2014) demonstraram que o tratamento de ratos submetidos a modelo xenográfico com a combinação entre berberina e doxorubicina aumentou a eficácia do quimioterápico, bem como preveniu efeitos colaterais conhecidos da droga. Nesse contexto, a BBR deve ser um bom tratamento para o neuroblastoma, já que os pacientes são crianças, e evitar efeitos colaterais deve ser visado. Portanto faz-se necessário investigar seus efeitos antitumorais sobre células de neuroblastoma, a fim de propor novos tratamentos aos casos graves da doença, bem como investigar os mecanismos pelos quais a BBR age.

1.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

ERO são moléculas reativas formadas a partir do oxigênio molecular. Elas ocorrem naturalmente no ambiente celular devido a sua produção em processos como a respiração mitocondrial, na qual cerca de 2% do oxigênio molecular sofre uma redução incompleta durante a cadeia transportadora de elétrons, formando assim o radical superóxido (O_2^-) (HOLZEROVÁ; PROKISCH 2015). Existem outras fontes de ERO conhecidas, tais como estresses ambientais e as enzimas xantina oxidase, ciclooxigenase e NADPH oxidase (HOLZEROVÁ; PROKISCH 2015; TONG et al., 2015).

Na célula, o radical superóxido, formado é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é capaz de provocar a formação de radical hidroxila, uma espécie altamente reativa. Isso ocorre quando aquele reage com ferro (Fe^{2+}), oxidando-os a íon férrico (Fe^{3+}) numa reação conhecida como reação de Fenton, ou quando o peróxido de hidrogênio reage com o superóxido, numa reação conhecida como Haber-Weiss (CONKLIN 2004; TONG et al., 2015). Todas essas moléculas reativas, mas principalmente o radical hidroxila, podem reagir com componentes celulares tais como ácidos nucleicos, lipídios de membrana e proteínas, e portanto representam risco à célula quando presentes em quantidades excessivas.

Por outro lado, as ERO também são importantes para a homeostase celular, agindo como mensageiros secundários ou mesmo na defesa contra microorganismos (HOLZEROVÁ; PROKISCH 2015). Para exercer tal função as ERO provocam

modificações reversíveis de oxido-redução. Mais especificamente, o peróxido de hidrogênio provoca a modificação de grupos tióis dos resíduos de cisteína, com consequente formação de pontes dissulfeto, alterando, de forma reversível, a atividade de proteínas (HOLZEROVÁ; PROKISCH 2015). Essa é uma das maneiras pelas quais as ERO podem auxiliar no controle de diversos processos como apoptose e autofagia (XIE et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Sendo assim é necessário um equilíbrio bem regulado entre produção de ERO e controle antioxidante. Quando esse equilíbrio falha ocorre o estresse oxidativo, que tem papel importante em muitas doenças, entre elas o câncer. Para evitar o estresse oxidativo existem mecanismos antioxidantes endógenos e exógenos. O sistema antioxidante exógeno é composto por moléculas antioxidantes ingeridas na nossa alimentação, tais como vitamina C, E, carotenoides e flavonóides (HOLZEROVÁ; PROKISCH 2015). O sistema antioxidantes endógeno, por sua vez, é composto por diversas enzimas entre elas: superóxido dismutase I, II e III (SOD1, SOD2 e SOD3), glutathione peroxidase (GPx), com oito isoformas conhecidas e a catalase (LEI et al., 2016). As enzimas superóxido dismutases estão presentes no citoplasma, mitocôndria e espaço extracelular respectivamente, e todas tem a função de converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio. Para tal a SOD I e III precisam como co-fator cobre e zinco enquanto a SOD II precisa de manganês (ZELKO; MARIANI; FOLZ; 2002). A família das GPx é composta por enzimas, classificadas por homologia, cuja maioria possuem na sua estrutura a selenocisteína e utilizam equivalentes redutores provenientes da glutathione, que passa de um estado reduzido a oxidado (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011). A função da GPx é provocar a redução do peróxido de hidrogênio à água, assim como a catalase, que por sua vez é uma hemoproteína encontrada nos peroxissomos (DEISSEROTH; DOUNCE, 1970; LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011)

O sistema antioxidante tem sua importância evidenciada quando analisamos a predisposição a algumas doenças em portadores de mutações que levam a alteração da quantidade ou atividade de enzimas antioxidantes. A acatalasemia, por exemplo, é uma condição em que ocorre a diminuição dos níveis de catalase, que não representa uma doença em si, mas favorece o aparecimento de diversas desordens (HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015; LEI et al., 2016). Ratos *knockout* para SOD1 tem suas funções reprodutivas prejudicadas, enquanto que *knockout* para SOD2 se

mostra letal (LEI et al., 2016). Níveis elevados de ERO podem inclusive estar envolvidas com a carcinogênese (ZIECH et al., 2011)

Sobre a relação entre ERO e câncer, hoje sabe-se que as células tumorais apresentam maiores taxas dessas espécies em relação às células normais (KUMAR et al., 2008). Esse fenômeno ocorre devido a vários fatores, como a alta taxa metabólica (TONG et al., 2015). Essa característica parece ser importante para a sobrevivência das células tumorais e para a progressão da doença (KUMAR et al., 2008; PANI et al., 2010). Alguns quimioterápicos são conhecidos por aumentar as ERO, e acredita-se que essas drogas podem ser seletivas uma vez que o limiar de toxicidade é atingido mais rapidamente nas células tumorais já que os níveis basais de ERO são elevados nessas células (TRACHOOTHAM et al., 2006).

Elevadas quantidades de ERO também podem desencadear a apoptose por causar dano ao DNA com consequente ativação da via intrínseca da apoptose. Moderadas quantidades de ERO podem diretamente ativar proteínas pró-apoptóticas, como ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*), ou inibir proteínas anti-apoptóticas (ZHANG et al., 2015). Ainda, a oxidação da cardiolipina, fosfolípido presente na membrana interna da mitocôndria, também pode induzir a apoptose por permeabilização da membrana mitocondrial externa e liberação para o citoplasma do citocromo c e AIF (*apoptosis inducing factor*) (KORYTOWSKI et al., 2011).

Todas essas vias mostram que a indução de morte celular pelas ERO é um processo bastante complexo. Terapias que atuam aumentando a quantidade de ERO podem ser eficientes no tratamento tumoral. Portanto, investigar a influência da BBR sobre o equilíbrio do estado redox em células de neuroblastoma é de grande valia.

1.5. PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR AMP

Muitas propriedades benéficas da BBR tem relação com a sua capacidade de fosforilar a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (ZHAO et al., 2014). A AMPK é uma enzima heterotrimérica, conservada entre eucariotos, com uma subunidade catalítica α , e duas subunidades regulatórias, β e γ , além de diversas isoformas. Sua função é controlar o metabolismo celular para manter a homeostase energética. Para isso, quando ocorrem aumentos na razão entre AMP/ATP, ela se torna ativada

passando a inibir as vias anabólicas, bem como ativar as vias catabólicas através da fosforilação de enzimas alvo, tais como a HMG-CoA redutase, acetil-CoA carboxilase e transportadores de glicose (WANG e GUAN, 2009). Assim, diversas situações que elevam a razão AMP/ATP, como hipóxia, exercícios e hipoglicemia provocam a ativação da AMPK (HAN et al., 2010).

Além da importância da AMPK em diversas síndromes metabólicas, esta quinase também está envolvida com o câncer (CARDACI et al., 2012; WANG e GUAN, 2009). Essa conexão foi inicialmente proposta quando descobriram a enzima quinase B1 do fígado (LKB1) como principal reguladora da AMPK, uma vez que a LKB1 é uma conhecida supressora tumoral. Isso parece ser contraditório, uma vez que a AMPK é uma enzima pró-sobrevivência. De fato, a AMPK pode contribuir para resistência tumoral por induzir a autofagia (HARHAJI-TRAJKOVIC et al., 2009). Entretanto, hoje sabemos que essa quinase também pode induzir a apoptose (CONCANNON et al., 2010). Tem sido mostrado que drogas usadas para tratar diabetes e que estimulam a AMPK, previnem o aparecimento de tumores e reduzem o crescimento de células tumorais (HUANG et al., 2008; MONAMI et al., 2011; ZAKIKHANI et al., 2006).

Para a ativação da enzima, na subunidade γ existem quatro sequências de repetições em tandem que compõem os motivos CBS. Esses motivos se organizam em dois pares para formar dois domínios conhecidos como Bateman, os quais podem ligar os nucleotídeos ATP, ADP ou AMP. Quando aumenta a concentração de AMP intracelular, estas moléculas se ligam a subunidade γ , o que gera uma ativação alostérica da AMPK com cerca de aumento em cinco vezes na sua atividade (TOWLER; HARDIE 2006). Mais importante do que essa ativação alostérica é a fosforilação da subunidade α no resíduo de Thr172: a LKB1 é ativa constitutivamente e provoca uma constante fosforilação desse resíduo, porém quando existe ATP ligado à subunidade γ a desfosforilação é estimulada, mantendo uma atividade basal da AMPK baixa. Por outro lado, quando existe AMP ligado à subunidade γ , a taxa de fosforilação da subunidade α é aumentada, assim como a sua desfosforilação é prevenida, levando a um aumento na atividade da enzima de pelo menos cem vezes. Adicionalmente, níveis aumentados de Ca^{2+} aumentam a fosforilação da AMPK através da enzima quinase quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKK) (MOUNIER et al., 2015).

Além do complexo sistema de ativação acima descrito, recentemente tem sido demonstrado que a AMPK responde a alterações pró-oxidantes de forma

independente das concentrações de AMP/ATP (CARDACI et al., 2012; EMERLING et al., 2009). Tem sido sugerido que esse controle pode ser devido a alterações oxidativas dos resíduos de cisteína das subunidades α e β .

Nesse sentido, Han et. al. (2010) demonstraram que a ativação da AMPK pela BBR depende de radical superóxido e peroxinitrito. Além disso, a fostorilação da AMPK provocada pela BBR, se mostrou importante na redução do potencial metastático em células de melanoma e na indução da citotoxicidade em células HepG2, (KIM et al., 2012; YU et al., 2014). Sendo assim, é interessante confirmar se a ação anti-tumoral da BBR em células de neuroblastoma é dependente ou não da AMPK.

1.6. APOPTOSE E P53

A apoptose é um processo de morte celular programada, fundamental para a manutenção da homeostase. Esse processo é imprescindível, por exemplo, no desenvolvimento de animais (JACOBSON et al., 1997), bem como para eliminar células danificadas que possam prejudicar o organismo. Sendo assim, células que apresentam danos no seu DNA normalmente são eliminadas por apoptose. Porém quando esse mecanismo falha a tumorigênese pode prosseguir. De fato, um dos *hallmarks* do câncer é a capacidade de resistir à morte celular (HANAHAN; WEINBERG 2011). Portanto drogas que desencadeiem morte celular, especialmente a apoptose, frequentemente são buscadas e estudadas para o tratamento de diversos tumores.

Algumas das características da apoptose são encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos (*membrane blebbing*), fragmentação do DNA e condensação do núcleo (DASGUPTA et al., 2016). Uma dos eventos iniciais é a desorganização da membrana plasmática, com a externalização da fosfatidilserina, a qual normalmente é encontrada na superfície interna da bicamada lipídica. Esse fenômeno ocorre para sinalizar aos macrófagos que a célula está em apoptose e portanto deve ser fagocitada (ASHMAN et al., 1995). Assim, o desencadeamento de um processo inflamatório é prevenido, diferente do que é visto, por exemplo, em células necróticas, cujo extravasamento do conteúdo citoplasmático no meio provoca a inflamação.

Existem duas vias principais que podem desencadear a apoptose: a extrínseca e a intrínseca, ambas envolvem a ativação de caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10) e efetoras (3, 6 e 7). A primeira ocorre em resposta a um sinal externo. Em resumo, um ligante liga a um receptor de morte celular e provoca o recrutamento e ativação de caspases iniciadoras no citoplasma, em especial a -8, que por sua vez provocam a ativação de caspases efetoras. A via intrínseca, por outro lado, detecta sinais de origem intracelular, tais como o dano ao DNA. Os principais reguladores são as proteínas da família Bcl-2, composta por proteínas anti (domínio BH1-BH4) e pró-apoptóticas (domínio BH1-BH3 ou BH3 apenas). A ativação das proteínas pró-apoptóticas leva a permeabilização da membrana mitocondrial externa, com consequente difusão para o citoplasma de proteínas normalmente presente no espaço intermembranas, em especial o citocromo c. Quando este está presente no citoplasma, ele se combina com a proteína APAF-1, e essa combinação é capaz de provocar a ativação da caspase-9, que por sua vez provoca a ativação das caspases efetoras, culminando na apoptose. As duas vias não são necessariamente excludentes, e o desencadeamento da via extrínseca pode levar a ativação da via intrínseca em paralelo (DASGUPTA et al., 2016).

A proteína p53 é uma supressora tumoral que atua principalmente promovendo ou inibindo a transcrição de genes alvos, que por sua vez induzem eventos como a apoptose ou parada no ciclo celular. A primeira pode ser desencadeada, por exemplo, quando danos ao DNA provocam a ativação da proteína, a qual induz aumento na expressão de *Noxa* e *Puma*, que são genes codificantes para proteínas com domínio BH3- apenas e cuja função é inibir as proteínas anti-apoptóticas (HANAHAN; WEINBERG 2011).

A proteína p53 é constitutivamente produzida, porém normalmente seus níveis permanecem baixos na célula. Isso é devido a uma regulação negativa principalmente pela proteína MDM2, a qual provoca a ubiquitinação da p53 para posterior degradação no proteossomo. Quando a célula é submetida a condições adversas, tais como hipóxia, ocorrem alterações pós traducionais capazes de estabilizar e ativar a p53, e assim ela passa a desempenhar sua função. Esse é um processo complexo que envolve não apenas modificações pós-traducionais da p53, mas também do MDM2. Na p53, existem pelo menos 24 sítios diferentes, principalmente nas regiões C e N terminais, onde modificações covalentes ocorrem. Essas modificações incluem

fosforilações, acetilações, metilações e ubiquitinações, e podem aumentar a estabilidade e/ou atividade por diferentes razões, a principal delas é a redução na interação entre p53 e MDM2 (LAVIN; GUEVEN 2006). Um importante sítio de fosforilação na p53 é o da serina 15. Ele pode ser encontrado sob diversas condições de estresse, como quando existe carência nutricional. Nesse caso a AMPK, por exemplo, pode provocar a fosforilação da p53 (JONES et al., 2005).

A importância dessa proteína é evidenciada na elevada quantidade de tumores com mutações inibitórias em *p53*, bem como na síndrome de Li-Fraumeni, caracterizada por predisposição ao desenvolvimento de algumas neoplasias devido a herança de um alelo *p53* mutante (VOGELSTEIN 1990). Além de impedir o processo tumoral, o status de p53 influencia bastante a resposta de células aos quimioterápicos, principalmente aqueles que agem via indução de dano ao DNA (SUN et al., 2016; VAZQUEZ et al., 2008). Sendo assim, faz-se necessário investigar se a BBR influencia a ativação dessa proteína, bem como o processo apoptótico em células de neuroblastoma.

1.7. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o exposto, sabemos que a BBR tem potencial para o tratamento de alguns tipos de cânceres. Entretanto, existe uma carência de trabalhos que abordem a BBR no tratamento específico do neuroblastoma. Essa doença ainda é de difícil tratamento, e leva muitas crianças a morte. Ainda, os pacientes que conseguem sobreviver tem que conviver com efeitos tardios desencadeados pelos tratamentos atuais. Nesse sentido, é importante investigar novas terapias que sejam eficazes e seguras. Uma vez que a BBR apresenta baixa toxicidade e ainda consegue atravessar a barreira hemato-encefálica, o presente estudo foi delineado com o intuito de testar a eficácia dessa molécula em células de neuroblastoma SH-SY5Y, bem como, ampliar e caracterizar seus efeitos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Investigar o efeito antitumoral da BBR em células de neuroblastoma SH-SY5Y, bem como, buscar uma explicação mecanística-molecular para os seus possíveis efeitos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a viabilidade das células SH-SY5Y expostas a uma curva de BBR e então identificar a menor concentração capaz de provocar citotoxicidade, que será utilizada nos experimentos seguintes;

2. Determinar a capacidade da BBR de induzir a apoptose nas células SH-SY5Y, bem como se esse efeito é dependente de AMPK;

3. Avaliar se ocorre redução na capacidade de migração nas células SH-SY5Y tratadas com BBR;

4. Avaliar se ocorre redução na capacidade de formação de colônias pelas células SH-SY5Y tratadas com BBR;

5. Determinar os níveis mitóticos e fases do ciclo celular em que as células SH-SY5Y se encontram após tratamento com BBR;

6. Avaliar se a BBR induz alteração da expressão gênica do *p53*, *Bax*, *Bcl-2* e *caspase 3* em células SH-SY5Y;

7. Quantificar os níveis de p53 fosforilada (serina 15) e caspase 3 em células SH-SY5Y submetidas ao tratamento com a BBR;

8. Determinar se a BBR altera a produção de ERO em células SH-SY5Y, bem como a expressão gênica e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx;

9. Avaliar se a BBR induz dano ao DNA de células SH-SY5Y.

3. MANUSCRITO CIENTÍFICO

A metodologia, os resultados e discussões desta dissertação são apresentadas sob a forma de manuscrito científico e representa a íntegra deste estudo. O manuscrito encontra-se nas normas da revista *Toxicology in vitro*. As referências citadas ao final da dissertação referem-se somente às citações que aparecem no item introdução desta dissertação.

**ANTITUMORAL EFFECTS OF BERBERINE AGAINST SH-SY5Y HUMAN
NEUROBLASTOMA CELLS**

LENZ, L. S.^A, DE OLIVEIRA, J. S.^A, PALMA, T. V.^A, TEIXEIRA, C. F.^B,
BARBISAN, F.^B, ANTONIAZZI, A. Q.^C, DA CRUZ, I. B. M.^D, ULRICH, H.^E, PILLAT,
M. M.^{E*}, DE ANDRADE, C. M.^{C*}.

^aGraduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bGraduate Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^cVeterinary Hospital, Center of Rural Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^dDepartment of Morphology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^eDepartment of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed: Micheli Mainardi Pillat, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, Prof. Lineu Prestes 748, São Paulo, S.P. 05508-000 Brazil, email:mmpillat@gmail.com or Cinthia Melazzo de Andrade, Veterinary Hospital, Center of Rural Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, email:cmelazzoandrade1@gmail.com.

Abstract

Neuroblastoma is a pediatric solid tumor with heterogeneous character and poor prognosis. In this context, the alkaloid berberine (BBR) has presented antitumoral properties in some cancer cells, but its effects and underlying mechanisms in human neuroblastoma cells are yet to be explored. . Our results reveal that the BBR treatment lead cells death in both 24h (20, 50, 100 and 300 μM) and 72h (50, 100 and 300 μM) in SH-SY5Y cells. BBR induced increase in levels of reactive oxygen species (ROS) without reducing antioxidant enzymes activities. Moreover, DNA damage was increased in BBR-treated cells, suggesting an impairment triggered by high levels of ROS. In addition, BBR increased the percentage of Annexin⁺ and phospho-p53⁺ cells, evidencing apoptotic death through the p53 pathway. AMPK activation was not required for these events triggered by BBR. Besides, here we show a reduction by almost half in migratory and forming colony abilities of cells treated with BBR, which is important, because these abilities are essential for cancer progression. In summary, BBR demonstrated cytotoxic and antitumoral effects and, therefore, has potential to be used as a drug for neuroblastoma treatment.

Keywords: cancer; alkaloid; reactive oxygen species; apoptosis; migration; AMPK

Introduction

Neuroblastoma is a pediatric solid tumor originating from sympathetic nervous system, which is responsible for 15% of child deaths by cancer (1). Even though it is easy to cure children younger than 18 months, the group with high risk disease has a bad prognosis. These patients are submitted to surgery, intensive multiagent chemotherapy, radiation, autologous stem cell transplantation and cis-retinoic acid treatment. Despite multimodal therapy, the tumor can metastasize and the event free survival in this group is less than 50% (2). Survivors have to live with undesirable side effects such as hypothyroidism, ovarian failure, hearing loss, dental issues, and growth failure (3).

There are several strategies for cancer treatment. Between them, apoptosis induction is frequently investigated in drug effectivity studies. Extrinsic or intrinsic pathways can trigger apoptosis. Strategies for DNA damage induction involve activation of proteins like p53, which in turn culminate in mitochondrial permeabilization, with release of cytochrome c and apoptosis inducer factor (AIF). Cytochrome c in combination with apoptosis protease-activating factor-1 (Apaf-1) form apoptosomes. This latter cleaves and activates initiator caspases, such procaspase-9, which in turn activates executioner caspases, such procaspase-3, and this way initiating apoptosis (4). Moreover, chemotherapy drugs can be toxic for cancer cells by increasing reactive oxygen species (ROS) levels with subsequent damage of cellular DNA, proteins and lipids. Through this mechanism and preventing metastasis and recurrence, some types cancer can be treatable.

A possible new target for cancer treatment is AMP-activated protein kinase (AMPK). This enzyme is a major energetic cell regulator and becomes activated when there is an increase in AMP/ATP ratios. AMPK inhibits anabolic activity and allows

catabolic pathways, thereby controlling energetic homeostasis (5). The link between AMPK and cancer became clear with the description of LKB1, a tumor suppressor, as being an upstream AMPK activator (6). Farther, AMPK promotes phosphorylation (ser15) and stabilization of p53 (7) and inhibits cellular growth.

In this context, published results indicate that berberine (BBR), an alkaloid present in plants of the Berberidaceae family, among other pharmacological effects, demonstrates antitumoral activity, evidenced in myeloma U266 (8), mouse melanoma B16F10 (9), breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 (10) and oral squamous cell carcinoma KB (11). At the same time, it has been shown that BBR activates AMPK in glomerulus mesangial cells (12), and therefore, this signaling pathway could mediate antitumor effects triggered by BBR. This study aims to investigate the antitumor effects of BBR on migration, proliferation and survival of SH-SY5Y human neuroblastoma cells, as well as to explore the mechanism triggered by this alkaloid, including possible involvement of oxidative stress, p53 and AMPK pathways.

Materials and methods

Cell culture and treatment: Human neuroblastoma cells SH-SY5Y were purchased from the European Collection of Cell Culture. The cells were cultured in DMEM/F12 (Gibco®, 12500062) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 2 g/L HEPES, 0.06 g/L penicillin, 0.1 g/L streptomycin sulfate and 2.4 g/L sodium bicarbonate and maintained in an incubator with a humidified atmosphere and 5% CO₂ at 37°C. Berberine chloride hydrate (BBR) and compound C were purchased from Sigma Aldrich and Cayman Chemicals Company (14050, 11967) respectively. For all

treatments, berberine and compound C were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The maximum final concentration of DMSO was 0.3% in the culture medium.

Determination of dead cells: 5×10^4 cells/ml were plated in complete medium and berberine at 0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM and 300 μM . After 24 and 72 hours 2.5 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide (Invitrogen, P3566) was added. Images were obtained by fluorescence microscopy (Axiovert 40 CFL, Zeiss) and both live and dead cells were counted.

Clonogenic assay: About 700 cells were plated in complete medium with or without BBR (50 μM) and grown for 14 days. To perform the stain, the medium was discarded, cells were washed once with PBS and gentian violet 0.2% (diluted in ethanol 2%) was added. After 30 min the dye was removed and the colonies were washed at least 5 times with water. After dry, the plate was scanned and analyzed by ImageJ software. *Scratch Wound Healing:* Cells were plated and let to grown in complete medium until reaching ~90% of confluence. Then, monolayers were scratched using a 200 μL sterile plastic pipette tip, and a new complete medium with berberine 50 μM and/or compound C 5 μM was added. Cells were photographed at 0 and 24 hours by microscopy (Axiovert 40 CFL, Zeiss) and images were analyzed by ImageJ software. The area of cell migration was calculated by subtracting the initial scratch from the final scratch area.

Cell cycle assay: For cell cycle determination, cells were plated in complete medium at an initial concentration of 1×10^5 cells/mL. On the next day, cells were treated with berberine 50 μM , followed by trypsinization after 24h. To cell cycle assay, fixation was performed using ethanol 75% -20°C for 4h at least. Then, cells were washed with PBS and incubated for 1h in room temperature with a solution of 0.1% Triton, 0.5% Tween and 10 $\mu\text{g/mL}$ of propidium iodide. The measurements were

performed on a flow cytometer (FACSVerse, Becton & Dickinson) and analyzed with Flowjo V10 software (Flowjo, Ashland, OR).

Annexin-V staining: cells were plated in complete medium at initial concentration of 1×10^6 cells/mL. On the next day, cells were treated with berberine (50 μ M) and/or compound C (5 μ M). After 24h of treatment, cells were detached and incubated for 30 min in a solution with HEPES (10 mM), supplemented with sodium chloride (150 mM), potassium chloride 5 mM, magnesium chloride 1 mM, calcium chloride 1.8 mM and antibody anti-annexin FITC 5 μ g/mL (BioLegend, 640906). Then cells were centrifugated and PBS 1x was added. Negative sample was determined using cells without antibody. The measurements were performed by flow cytometry.

P53 phosphorylated and caspase 3: 1×10^6 cells/ml were plated in complete medium. In the next day, cells were treated with berberine 50 μ M and/or compound C 5 μ M. After 24h, trypsinization was performed followed by fixation with paraformaldehyde 4% for 10 min at room temperature. Then cells were centrifuged for 5 min at 2100 rpms and resuspended in ethanol 100% at -20°C for at least 12 h. After, cells were centrifuged again and incubated with 1,5-3% SFB (diluted in PBS 1x) for 20 min. Sample were incubated with primary antibody phospho-p53 at serine 15 (1:100, Cell signaling, 9284) or caspase 3 (1:500, Santa Cruz, sc-7148) for 30 min, washed with PBS and incubated with secondary antibody Alexa Fluor 488 (1:500, A-11005, ThermoFisher,) for more 30 min. Cells were washed with PBS again and resuspended in 500 μ L PBS. Negative sample was determined using cells labeled only with antibody Alexa Fluor 488. The measurements were performed in a Flow Cytometer BD FACSVerse and analyzed Flowjo V10 software (Flowjo, Ashland, OR) according to Pillat and co-workers, with minor modifications (13).

Quantitative QT-PCR assay: 6×10^5 cells/mL were plated in complete medium. In the next day, cells were treated with berberine 50 μ M. The expression of *p53*, *BAX*, *Bcl-2*, *caspase 3*, *superoxide dismutase 1 (SOD1)*, *SOD2*, *catalase* and *glutathione peroxidase* were measured by qRT-PCR assay as previous describe by Barbisan et al (14), with minor modifications. Briefly, total RNA was extracted using Trizol (Ludwing-Biotec, Brazil) and measured by a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. To perform reverse transcription, RNA (1000 ng/ μ L) was incubated with 0.2 μ L of DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 5 minutes, followed by heating at 65 °C for 10 minutes. The cDNA was generated with 1 μ L of Iscript cDNA and 4 μ L of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA) according to the reaction conditions: 5 °C for 10 minutes, 25 °C for 5 minutes, 85 °C for 5 minutes and 5 °C for 60 minutes. The qRT-PCR was conducted in a Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN biotechnology, Germany), with 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN biotechnology, Germany), and the reaction conditions: 95 °C for 3 min followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s followed by a melt curve of 60 °C to 90 °C in 0.5 °C increments for 5 s. The qRT-PCR reactions of each sample were made in duplicate, using 1 μ M of each primer, 1000 ng/ μ L of cDNA, RNAase-free water and 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN biotechnology, Germany), in a final volume of 20 μ L. The beta-actin gene was used as a housekeeping gene, and its expression level was used as an internal control. The relative expression was calculated using the comparative Cytosine- Timine (Ct) and was expressed as the fold expression compared to the control. The specific primer pairs used are show in Supplementary Table 1.

2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) ROS detection assay: Cells were cultivated in 75cm² flasks and let to grown in complete medium until reaching 80% of

confluence. Then a new complete medium with/without berberine 50 μM was added. After 24 h of exposure, cells were washed and detached using trypsin followed by dilution in PBS 1x. Part of the sample was used to perform the DCFDA assay, and other part of sample was frozen to measure the activity of catalase (CAT) and GPx antioxidant enzymes. All samples were normalized by measure protein levels kit (Labtest 99). To perform DCFDA assay, 50 μL of sample was incubated for 1 h with 190 μL of TRIS HCl 10mM pH 7.4 and 10 μL of DCFH-DA 0,1 mM. Fluorescence was detected in a SpectraMax reader with 525 nm of emission and 488 nm of excitation.

Catalase and GPX activity assay: After sample preparation as described above, the catalase activity assay was performed as previously described by Nelson and Kiesow, 1972 (15), with modifications. Briefly, the H_2O_2 decomposition was monitored by reading the reduction of absorbance at 240 nm every 10 seconds during 90 seconds. The tube reaction contains TFK 50 mM pH 7.0, hydrogen peroxide 10 mM and sample. The GPX activity assay was performed as previously described by Flohe'L 1984 (16), with modifications. Briefly, the NADPH consumption reaction was monitored by reading the reduction of absorbance at 340 nm every 15 seconds during 5 minutes. The tube reaction contains NaN_3 1 mM, H_2O , TFK-EDTA 3.12 mM pH 7.0, GSH 0.2 mM, GR 2.5 U/mL pH 7.0, NADPH 0.2 mM and H_2O_2 0.4 mM and sample.

Superoxide dismutase activity assay: 1×10^6 cells/ml were plated in 6-well plates in complete medium. In the next day, cells were treated with berberine 50 μM . After 24 h of exposure, cells were washed and detached using trypsin followed by dilution in PBS. Samples were frozen until further use. The assay was performed as previously described by McCord e Fridovich 1969 (17), with modifications. Briefly, epinephrine oxidation by O_2^- , which is prevented by superoxide dismutase, produces a color which is monitored by reading every 30 seconds during 5 minutes the increase in absorbance

at 480 nm. The reaction tube contained glycine (50 mM), pH 10.5, epinephrine (60 mM) and the sample. An unit of SOD activity is equal to the quantity of SOD needed to inhibit 50% of epinephrine oxidation under experimental conditions. Samples were normalized by their protein concentrations.

Comet assay: Comet assay was performed as previously described by Mckelvey-martin et al 1993 (18). Briefly, 1×10^6 cells/ml were plated in 24-well plates in complete medium with or without BBR (50 μ M). After 24h, cells were harvested and embedded in 0.75% low melting agarose and put in slides precoated with agarose (1.5%). The slides were incubated in a lysis solution (1.9 M NaCl, 0.1 M EDTA, 7.8 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, and 1% Triton X-100) for 1 day. Then they were submerged in cold alkaline buffer (0.3 M NaOH and 1 mM EDTA, pH>13) for 20 min and submitted to electrophoresis at 25 V and 300 mA for 20 min. Neutralization was performed with a neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) thrice, followed by three washes with water and air-dried. Fixation was performed with 15% trichloroacetic acid containing 5% zinc sulfate and 5% glycerol followed by staining with a solution of silver nitrate (5% sodium carbonate, 0.1% ammonium nitrate, 0.1% silver nitrate, 0.25% tungstosilicic acid and 0.15% formaldehyde) for 40 minutes and stopped with acetic acid 1% (5 min). Dried slide were photographed, and comets were counted.

Statistical analysis: All Statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and the results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The comparisons were conducted by t-test or two-way ANOVA followed by Dunnett post-hoc test for multiple comparisons. Most experiments were repeated at least 3 times. 'p' value below 0.05 was considered significant.

Results

Effect of BBR on cell death

BBR is known to decrease viability of some cell lines, such as myeloma U266 (8) mouse melanoma B16F10 (9), breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 (10) and oral squamous cell carcinoma KB (11). In order to determine whether BBR is able to induce SH-SY5Y cell death and to select a drug concentration, we performed a concentration-effect curve and used propidium iodide as a marker of dead cells. Cells were treated with BBR at concentrations of 0, 5, 10, 20, 50, 100 and 300 μM for 24 and 72 h. It was observed that upon 24h of treatment with BBR (20 μM), the population of live cells were reduced about 20% and this effect remained at higher drug concentrations. The same was observed at BBR concentrations above 50 μM after 72 h of treatment (Figure 1). These results demonstrate that while BBR at 20 μM concentration induces cell death at 24 h, this does not remain at longer time, being just an acute effect. On the other hand, BBR at 50 μM concentration provokes a significant increase in cell death both at 24 and 72 h, suggesting that SH-SY5Y cells are unable to recover from initial injury or they are unable to develop resistance mechanism to 50 μM BBR treatment. Following this observation, we used the concentration of 50 μM of BBR for 24 h to elucidate the effects and mechanism triggered by this alkaloid in SH-SY5Y cells.

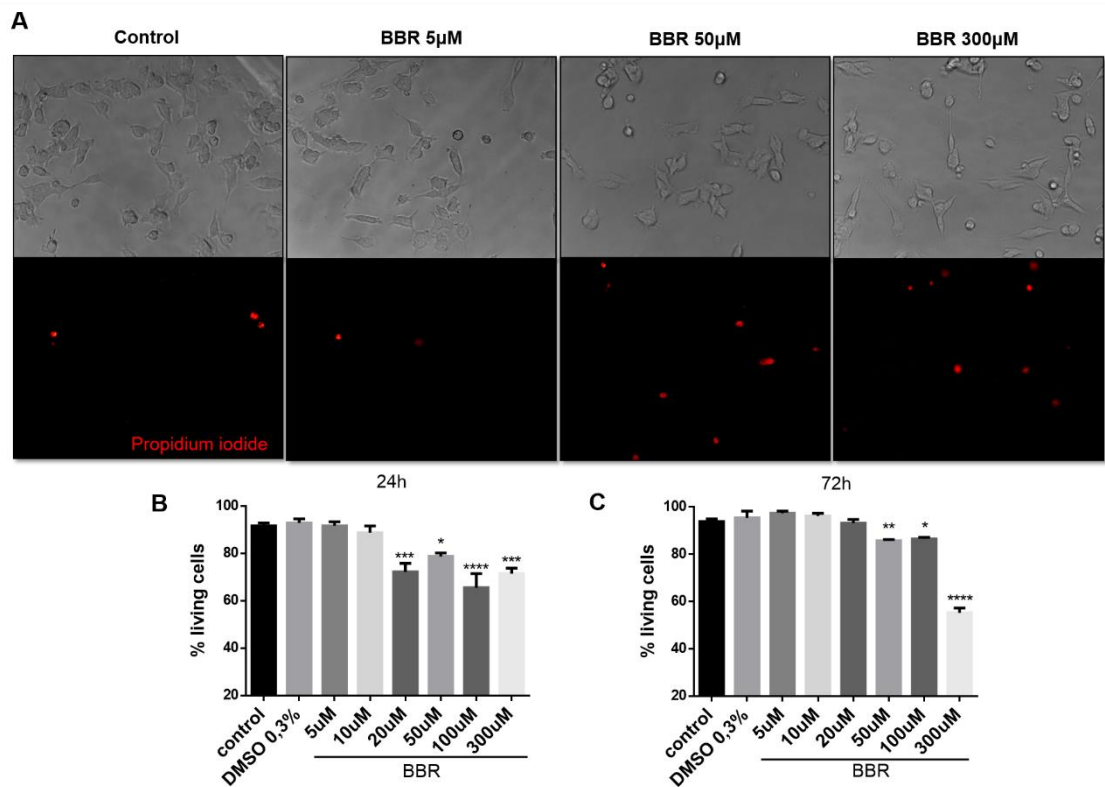


Figure 1: Berberine (BBR) induces cell death in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Cells were incubated with different concentrations of BBR 0, 5, 10, 20, 50, 100 or 300 μM . Images were obtained by fluorescence microscopy after propidium iodide staining to both live and death cells be quantified (A). Percentage of living cells after 24 h (B) and 72 h (C) of treatment. Data are shown as mean \pm SEM for three independent experiment, * $p < 0.05$.

Effect of BBR on oxidative stress

The toxicity of agents against cancer cells can be mediated by ROS (19). The reason for this is, because the cancer cells produce more ROS than the normal ones. Therefore, when a molecule increases the ROS levels, cancer cells will be more sensitive, since they achieve the cytotoxic threshold faster (20). In other to discover whether BBR is able to perturb the oxidative homeostasis, we treated cells with BBR 50 μM for 24 h, and then incubated with DCFHDA for ROS detection. BBR increases

50% ROS compared to control (Figure 2A). Next, we investigated whether this happens through change in gene expression levels or activity of antioxidant enzymes. To assess this question, RT-PCR and the activity of antioxidant enzymes were performed as described in the Methods' section. As shown in Figure 2B, BBR treatment did not change gene expression of *SOD1* and *CAT*, but it apparently decreased expression of *SOD2* and *GPX*. On the other hand, catalase activity increase, while glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities did not reveal any significant changes, although superoxide dismutase seemed to be a little more active when cells had been treated with BBR.

The increase in ROS may result in cell death by cellular damage, such as DNA breaks and lipid peroxidation, and by mitochondrial membrane permeabilization. The latter mechanism is triggered by cardiolipin oxidation, which promotes cytochrome c release and permeabilization of the outer mitochondrial membrane with subsequent apoptosis (21). Here, we used the comet assay to show that BBR-induced ROS increased DNA damage. As is shown in Figure 2F, DNA of treated cells was more fragmented than that of untreated cells.

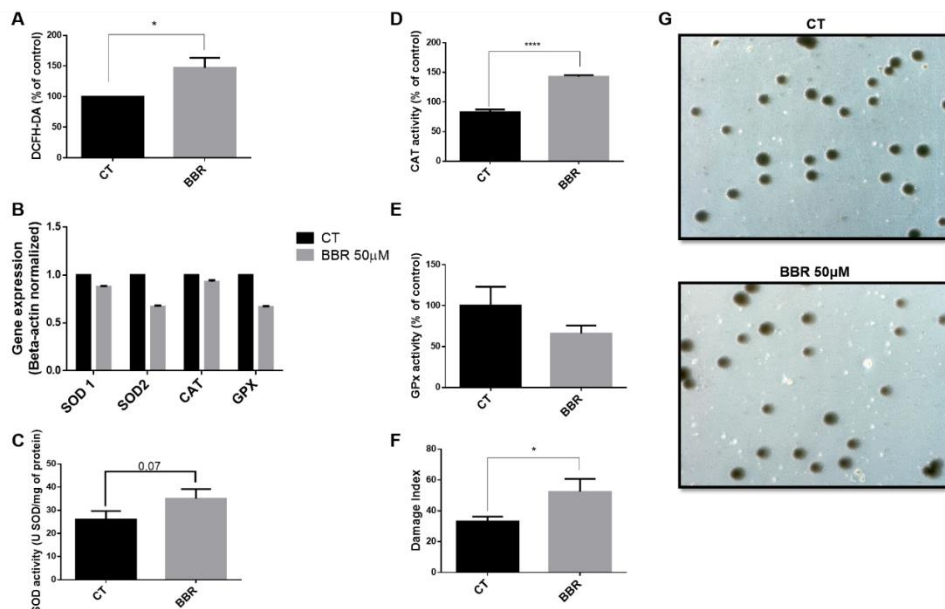


Figure 2: BBR changes the oxidative status of SH-SY5Y cells after 24h of treatment with BBR (50 μ M). (A) ROS were measured by the DCFH-DA assay and normalized by protein levels. Data are shown as percentages relative to untreated controls. (B) The gene expression of antioxidant enzymes relative to control are shown, normalized by beta-actin levels. (C, D, E). Enzyme activity of antioxidant enzymes (F). DNA damage of cells exposed or not to BBR measured by the comet assay (G) comet assay images. Data shown are mean \pm SEM for three experiment, * $p < 0.05$.

BBR increases phosphorylation of p53 and induces apoptotic death in SH-SY5Y cells

Although DNA was fragmented in BBR-treated cells, we did not detect apoptotic cells by comet assay, what was an unexpected result. Considering that DNA fragmentation is a late event during apoptosis, we used annexin-V staining of cells cultured in the absence or presence of 24h treatment with BBR (50 μ M) to feature phosphatidylserine translocation to the external side of plasma membrane, which is an earlier event of apoptosis (22). As shown in Figure 3 (A and B), the frequency of annexin⁺ cells increased significantly in BBR-treated samples, demonstrating that this alkaloid triggered apoptosis.

In order to elucidate the mechanism triggered by BBR treatment, we measured the expression of apoptotic genes *p53*, *caspase-3* and *BAX* and the anti-apoptotic *BCL-2* by qRT-PCR. Gene expression of *BAX/BCL-2* did not change while mRNA transcription levels of *p53* and *caspase-3* diminished (Figure 3C). As shown by flow cytometry analysis, total caspase-3 levels did not change (Figure 3E), while the presence of active, serine 15 phosphorylated p53 was enhanced following treatment with BBR (Figure 3F).

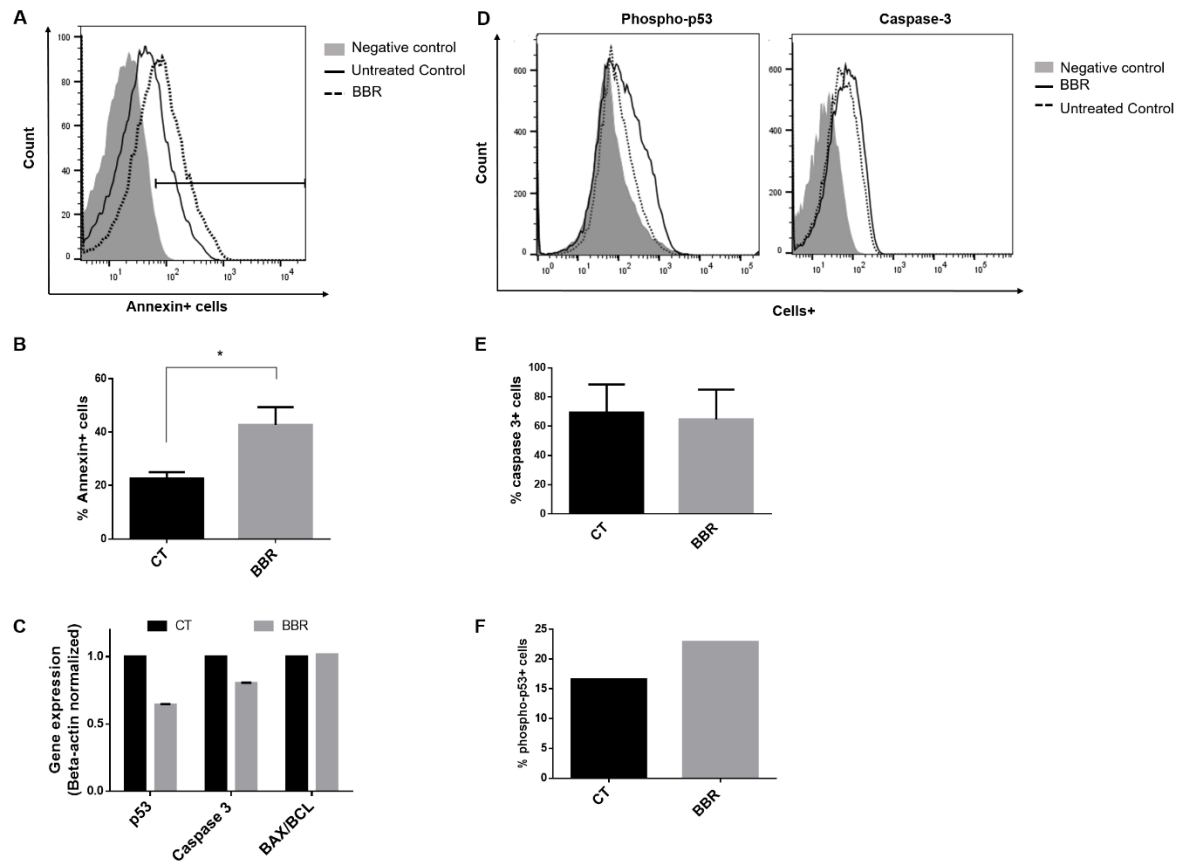


Figure 3: Effects of 24 h-BBR treatment (50 μ M) on apoptosis and phosphor-p53 and caspase-3 protein levels in SH-SY5Y cells. (A) Apoptosis was assessed by measuring annexin+ cells through flow cytometry techniques. (B) The mean \pm SEM of annexin+ cells of three independent experiments are shown. (C) Gene expressions of *p53*, *caspase-3*, and ratios between *bax/bcl-2* in cells treated with BBR (50 μ M) relative to control cells, normalized by beta actin levels. (E and F) Percentages of caspase-3⁺ and phospho-p53⁺ cells. * $p < 0.05$.

Anti-tumoral activity of BBR does not depend on AMPK activity

It is known that BBR promotes phosphorylation of AMPK, and this could be a mechanism that determines its anti-tumoral activity (23-25). To evaluate whether this hypothesis is true, we tested whether BBR is able to provoke p53 phosphorylation and apoptosis even when the AMPK is blocked in SH-SY5Y cells. As it is shown in Figure

4, the co-treatment with Compound C (an AMPK inhibitor) did not prevent BBR-induced effects, as increases in annexin⁺ and phospho-p53⁺ cells remained in the presence of the alkaloid.

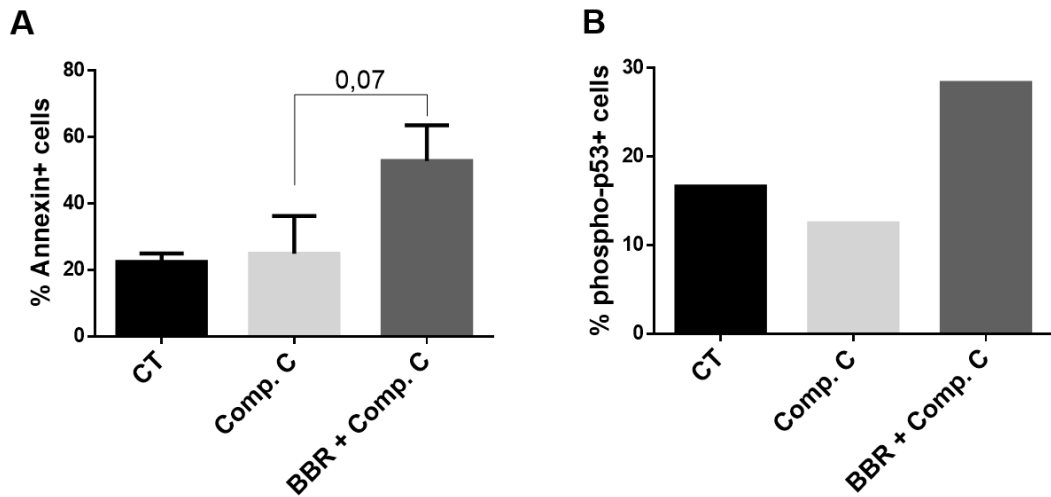


Figure 4: Effects of AMPK blockade (Comp. C 5 μ M) on (A) apoptosis and (B) phosphorylation of p53 triggered by BBR (50 μ M) in SH-SY5Y cells.

Effects of BBR on cell cycle progression of SH-SY5Y cells

After 24h of treatment with 50 μ M BBR, cells were harvested, fixated, permeabilized, stained with propidium iodide and submitted to cell cycle determination by flow cytometry, revealing a modest, however statistically not relevant increase in both S and G2 phase of BBR-treated cells (Figure 5).

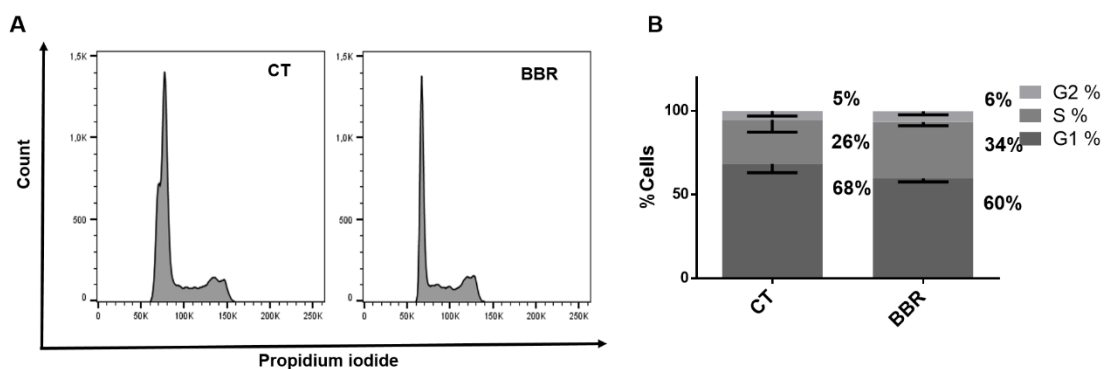


Figure 5: (A) Effects of BBR (50 μ M) on cell cycle progression after 24h of treatment of SH-SY5Y cells. (B) Mean \pm SEM of cells in each phase of cell cycle. Three independent experiments were performed, * $p < 0.05$.

BBR inhibits migration of SH-SY5Y cells

It is known that metastasis is the most important complication of cancer happens in most of neuroblastoma patients at the time of diagnosis (26). The migratory ability is necessary for cancer cells metastasize (27). In order to test whether BBR is able to reduce the migratory ability of neuroblastoma cells, we performed the wound-healing assay. The monolayer of cells was scratched and BBR 50 μ M was added. After 24h, BBR reduced about 50% cell migration when compared to untreated control cells (Figure 6).

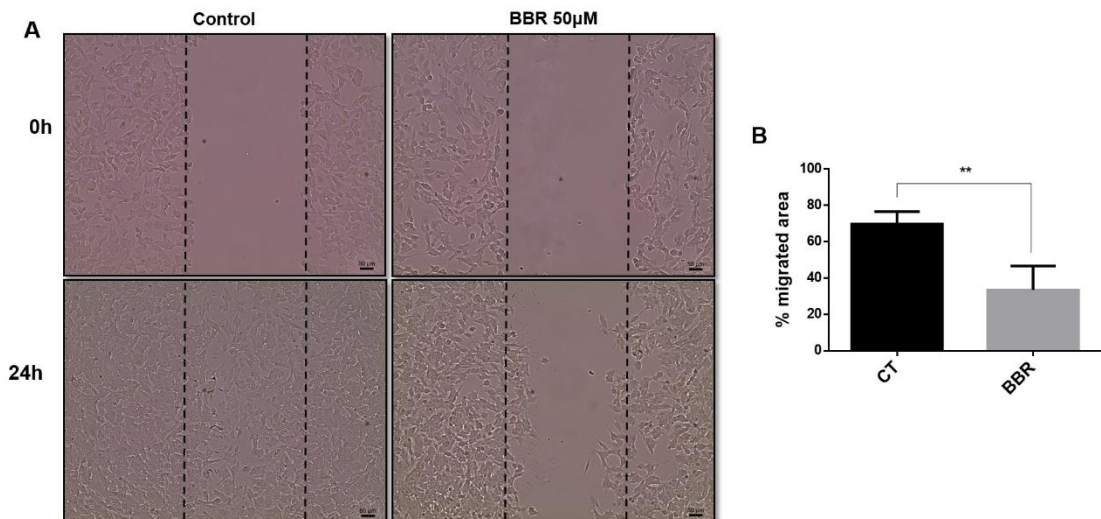


Figure 6: BBR inhibits migration of SH-SY5Y cells. (A) When the cells achieve ~90% confluence the monolayer was scratch, and cells were let to migrated during 24h with or without 50 μ M BBR. (B) The area where cells could migrated was calculated and the mean \pm SEM of migrated area for three independent experiment is shown, * $p < 0.05$.

BBR decreases forming colony ability of SH-SY5Y cells

To form metastasis, cells which detached from primary tumor must have the ability to grow and form a new tumor, and in a population, only few cells are able to grow indefinitely and form colonies. This is important because it is believed that these cells are responsible for relapse and resistance, besides metastasis (28, 29). To assess the colony forming ability, 700 cells/well were plated with or without 50 μ M BBR and let to grow in the clonogenic assay. After 14 days, BBR inhibited around 40% of the colonies formed (Figure 7B); in other words, BBR reduced almost to the half the number of cells able to form colonies. The mean size of colonies was reduced in the same proportion (Figure 7C).

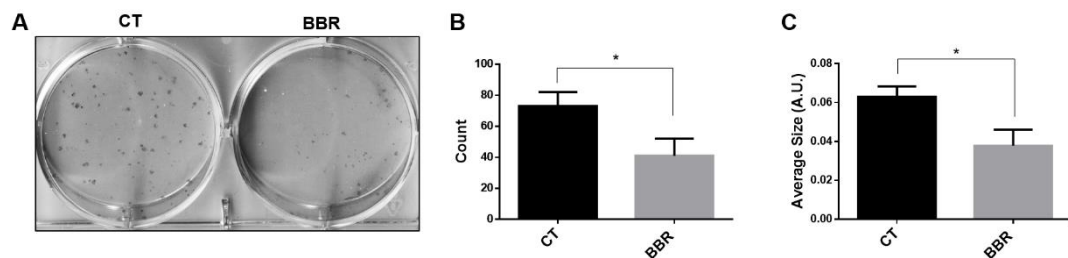


Figure 7: Effects of 50 μ M BBR on colony forming ability. (A) 700 cells were plated and grown for 14 days. The numbers of colonies formed (B) and the mean \pm SEM of mean size in arbitrary unit (A.U.) are shown in (C). Three experiments were performed, * $p < 0.05$.

Discussion

A range of cancer cell lineage that are sensitive to BBR, such as U266 (8), B16F10 (9), MCF-7 and MDA-MB-231 (10), HeLa (30) and KB (11). However, this sensitivity fluctuate among different concentrations, from 26nM (11) until 150 μ M

depending on the tumor type, or even resistance against high doses, such as 800 μ M in the human cervix carcinoma C33a cell line (30). In this study, we demonstrated that BBR at 50 μ M concentration promotes apoptotic death of SH-SY5Y cells through p-p53 and ROS induction. Besides that, our data suggest that SH-SY5Y cells do not develop resistance against 50 μ M BBR, as evidenced by propidium iodide staining (Figure 1C) and the lower size of colonies formed in clonogenic assay (Figure 7).

It is well documented that apoptosis is triggered in cells treated with BBR (8, 31, 32). We demonstrated that this process also occurs in SH-SY5Y cells upon 50 μ M BBR stimulus, at the same time that p53 is phosphorylated at serine15 (Figure 3B and E). Even BBR being able to control gene expression (33), there was no change in the expression of investigated genes, and this suggests that BBR does not perform this role in SH-SY5Y cells. These results demonstrate that, in the cell lineage studied, BBR positively regulates posttranslational control of p53 and suggest an intracellular signaling pathway that might serve as key determinants of apoptosis-induced BBR. These agree with the study of Choi et al 2008 (34), who observed that p53⁺ SH-N-SH neuroblastoma cells are more susceptible to BBR than p53⁻ cells SK-N-MC. On the other hand, our data demonstrate that phosphorylation of AMPK is not important to BBR-induced apoptosis and activation of p53 in SH-SY5Y cells and diverge from a previous study in HepG2 cells (liver cancer), reporting that inhibition of AMPK by both Compound C and RNA interference reverses cytotoxic effects of BBR (25).

We observed augmented ROS production upon BBR treatment (Figure 2A), as well as increased DNA breaks observed by the comet assay, suggesting that the alkaloid causes oxidative damage (Figure 2F and G). Noteworthy, the increase in ROS happens without inhibition of antioxidant enzymes. In fact, treatment with BBR induces antioxidant mechanisms, which probably is an attempt of survival by the cell.

These results suggest that BBR induces production of ROS by different mechanisms than blocking the antioxidant defense. Enhanced ROS levels probably is related to release of cytochrome c and apoptosis inducing factor (AIF) from mitochondria, triggering caspase-independent apoptosis. This pathway was detected by Xie *et al* 2015 (10) in breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with BBR, and must occur in SH-SY5Y cells, since we did not observe alterations in caspase-3 expression.

Besides cell cytotoxicity, our results demonstrate that BBR treatment affects two important processes for cancer progression: migration and forming colony ability. One of the first steps of metastasis is migration and invasion of surrounding tissues. The migration assay revealed that BBR reduces drastically the migration of SH-SY5Y cells (Figure 4). The here described results are in line with those of previous studies focusing on A375, Hs29, SCC-4, SW620 and LoVo cell lines (35-37). Metastasis is the most aggravating complication in cancer, since the majority of death of patients is caused by metastasis instead of primary tumor. The most common site of metastasis in neuroblastoma is bone marrow and it is associated with bad prognosis (38). Once BBR can contribute to reduction of migratory ability, it may prevent metastasis and increases the event free survival.

Moreover, it is known that few cells in a primary tumor are able to provoke metastasis. According to cancer stem cell (CSC) theory, these are the subsets of cancer cells able to form a tumor and metastasize (39). Besides that, these cells are responsible for tumor recurrence (40). CSC are capable of indefinite self-renewal and generate differentiated cells, recreating a new heterogeneous tumor. In other words, these cells are able to form colonies, while other differentiated cancer cells have limited proliferating capacities and do not form colonies. We demonstrated that BBR-treatment reduces by 40% the number of colonies formed (Figure 7). Therefore, the reduction of

forming colonies ability by treatment with BBR can contribute to (1) prevention of metastasis and (2) prevention of recurrence. Moreover, our data demonstrate a reduction in mean size of colonies, indicating a lower number of cells in each colony, and confirm that SH-SY5Y cells are sensitive to BBR even during long time of exposure.

Considering that (1) there is no efficient treatment to patients with high risk neuroblastoma, (2) the event free survival in this group is less than 50% (2) and (3) the treatment available nowadays can trigger undesirable consequences (3), here we demonstrate that BBR has the potential to be considered as a novel strategy for neuroblastoma treatment. Therefore, more studies are necessary before the implementation as a therapeutic approach. The benefit of BBR as chemotherapeutic agent is the absence of toxicity to normal cells, as shown by Hisiao-Li Wu et al 2015 (41), or to liver and kidney, as shown by Liu et al 2015 (37). A hypothesis explaining the cancer-cell-selective-toxicity is that BBR develops its cytotoxic effect by ROS induction, and since cancer cells have higher ROS level than healthy cells, BBR is toxic just for tumor cells. The safety of drugs is especially important for neuroblastoma treatment, because the patients are children, and side effects may be dangerous. Thinking about this and because neuroblastoma is a neurologic tumor, further studies are needed to investigate the effects of BBR in nervous system cells.

Moreover, additional investigations about effects of combined treatment between BBR and conventional chemotherapy drugs must be performed to assess the possible increase of treatment efficacy. In this way, Mittal *et al* 2014 (9) demonstrated that doxorubicin in combination with BBR have their cytotoxicity increased *in vitro*, and the tumor growth reduced in a xenografic model when compared to doxorubicin alone. Besides, BBR also reduces the side effects caused by doxorubicin.

In resume, our data suggest that BBR has therapeutic potential for neuroblastoma treatment through cytotoxic effects and reduction of migratory and colony forming abilities. This study provide us insights about antitumoral activity of BBR, as well as with novel potential neuroblastoma treatment options. Therefore, further studies are needed to assess the efficacy and safety of BBR administration *in vivo*.

Acknowledgments:

H.U. acknowledges grant support from the São Paulo State Foundation FAPESP (project No. 2012/50880-4). M.M.P. is grateful for a postdoctoral fellowship from FAPESP (2015/19478-3). This study also was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico- CNPq. We also acknowledge fellowships from CNPq and CAPES.

References

1. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report. 2014.
2. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):289-97.
3. Cohen LE, Gordon JH, Popovsky EY, Gunawardene S, Duffey-Lind E, Lehmann LE, et al. Late effects in children treated with intensive multimodal therapy for high-risk neuroblastoma: high incidence of endocrine and growth problems. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(4):502-8.
4. Dasgupta A, Nomura M, Shuck R, Yustein J. Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. *Int J Mol Sci.* 2016;18(1).
5. Cardaci S, Filomeni G, Ciriolo MR. Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 9):2115-25.
6. Hardie DG, Alessi DR. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol.* 2013;11:36.

7. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2005;18(3):283-93.
8. Hu HY, Li KP, Wang XJ, Liu Y, Lu ZG, Dong RH, et al. Set9, NF-kappaB, and microRNA-21 mediate berberine-induced apoptosis of human multiple myeloma cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(1):157-66.
9. Mittal A, Tabasum S, Singh RP. Berberine in combination with doxorubicin suppresses growth of murine melanoma B16F10 cells in culture and xenograft. *Phytomedicine*. 2014;21:340-7.
10. Juan X, Yinyan X, Xinyan H, Yanni C, Jing F, Mingming X, et al. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. *Tumor Biology*. 2014;36:1279-88.
11. Kim JS, Oh D, Yim MJ, Park JJ, Kang KR, Cho IA, et al. Berberine induces FasL-related apoptosis through p38 activation in KB human oral cancer cells. *Oncol Rep*. 2015;33(4):1775-82.
12. Zhao L, Sun LN, Nie HB, Wang XL, Guan GJ. Berberine improves kidney function in diabetic mice via AMPK activation. *PLoS One*. 2014;9(11):e1113398.
13. Pillat MM, Lameu C, Trujillo CA, Glaser T, Cappellari AR, Negraes PD, et al. Bradykinin Promotes Neuron-Generating Division of Neural Progenitor Cells via ERK Activation. *Journal of Cell Science*. 2016.
14. Barbisan F, Motta JR, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, et al. Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. *Plos One*. 2014;9(10).

15. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). 1972.
16. Flohé L, Günzler WA. [12] Assays of glutathione peroxidase. 1984;105:114-20.
17. McCords JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)* The Journal of Biological Chemistry. 1969;244:6049-65.
18. McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review Mutation Research. 1993;288 47-63.
19. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. Cancer Cell. 2006;10(3):241-52.
20. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. Cancer Cell. 2006;10(3):175-6.
21. Korytowski W, Basova LV, Pilat A, Kernstock RM, Girotti AW. Permeabilization of the Mitochondrial Outer Membrane by Bax/Truncated Bid (tBid) Proteins as Sensitized by Cardiolipin Hydroperoxide Translocation. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2011;286:26334-43.
22. Ashman RF, Peckham D, Alhasan S, Stunz LL. Membrane unpacking and the rapid disposal of apoptotic cells. Immunology Letters. 1995;48:159-66.
23. Kim HS, Kim MJ, Kim EJ, Yang Y, Lee MS, Lim JS. Berberine-induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression. Biochem Pharmacol. 2012;83(3):385-94.

24. Li W, Hua B, Saud SM, Lin H, Hou W, Matter MS, et al. Berberine regulates AMP-activated protein kinase signaling pathways and inhibits colon tumorigenesis in mice. *Mol Carcinog*. 2015;54(10):1096-109.
25. Yu R, Zhang ZQ, Wang B, Jiang HX, Cheng L, Shen LM. Berberine-induced apoptotic and autophagic death of HepG2 cells requires AMPK activation. *Cancer Cell Int*. 2014;14:49.
26. Koivusalo AI, Pakarinen MP, Rintala RJ, Saarinen-Pihkala UM. Surgical treatment of neuroblastoma: twenty-three years of experience at a single institution. *Surg Today*. 2014;44(3):517-25.
27. Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(2):91-100.
28. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):727-38.
29. Vangipuram SD, Wang ZJ, Lyman WD. Resistance of stem-like cells from neuroblastoma cell lines to commonly used chemotherapeutic agents. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(3):361-8.
30. Saha SK, Khuda-Bukhsh AR. Berberine alters epigenetic modifications, disrupts microtubule network, and modulates HPV-18 E6-E7 oncoproteins by targeting p53 in cervical cancer cell HeLa: a mechanistic study including molecular docking. *Eur J Pharmacol*. 2014;744:132-46.
31. Hyun MS, Hur JM, Mun YJ, Kim D, Woo WH. BBR induces apoptosis in HepG2 cell through an Akt-ASK1-ROS-p38MAPKs-linked cascade. *J Cell Biochem*. 2010;109(2):329-38.
32. Kalaiarasi A, Anusha C, Sankar R, Rajasekaran S, John Marshal J, Muthusamy K, et al. Plant Isoquinoline Alkaloid Berberine Exhibits Chromatin Remodeling by

Modulation of Histone Deacetylase To Induce Growth Arrest and Apoptosis in the A549 Cell Line. *J Agric Food Chem.* 2016;64(50):9542-50.

33. Yuan ZY, Lu X, Lei F, Chai YS, Wang YG, Jiang JF, et al. TATA boxes in gene transcription and poly (A) tails in mRNA stability: New perspective on the effects of berberine. *Scientific reports.* 2015.

34. Choi MS, Yuk DY, Oh JH, Jung HY, Han SB, Moon DC, et al. Berberine Inhibits Human Neuroblastoma Cell Growth through Induction of p53-dependent Apoptosis. *Anticancer Research.* 2008;28:3777-84.

35. Singh T, Vaid M, Katiyar N, Sharma S, Katiyar SK. Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma cancer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase-2, prostaglandin E(2) and prostaglandin E(2) receptors. *Carcinogenesis.* 2011;32(1):86-92.

36. Ho YT, Yang JS, Li TC, Lin JJ, Lin JG, Lai KC, et al. Berberine suppresses in vitro migration and invasion of human SCC-4 tongue squamous cancer cells through the inhibitions of FAK, IKK, NF-kappaB, u-PA and MMP-2 and -9. *Cancer Lett.* 2009;279(2):155-62.

37. Liu X, Ji Q, Ye N, Sui H, Zhou L, Zhu H, et al. Berberine Inhibits Invasion and Metastasis of Colorectal Cancer Cells via COX-2/PGE2 Mediated JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *PLoS One.* 2015;10(5):e0123478.

38. DuBois SG, Kalika Y, Lukens JN, Brodeur GM, Seeger RC, Atkinson JB, et al. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *Journal Pediatric Hematology Oncology.* 1999;21:181-9.

39. Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One.* 2008;3(8):e3077.

40. Li Y, Rogoff HA, Keates S, Gao Y, Murikipudi S, Mikule K, et al. Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. *PNAS*. 2014;112:1839–44.
41. Wu HL, Chuang TY, Al-Hendy A, Diamond MP, Azziz R, Chen YH. Berberine inhibits the proliferation of human uterine leiomyoma cells. *Fertil Steril*. 2015;103(4):1098-106.

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos tivemos a comprovação de que a BBR 50 μ M tem efeitos citotóxicos sobre as células SH-SY5Y através da indução de ERO e apoptose. Os resultados mostram que, esta última provavelmente ocorre via indução de fosforilação de p53, e que esses eventos são independente de AMPK. O aumento nas ERO foi gerado por algum mecanismo que não a inibição da defesa antioxidante celular, uma vez que a atividade das enzimas antioxidantes não foram inibidas, pelo contrário, a catalase teve uma atividade aumentada. Portanto, o aumento nos níveis das ERO deve ser devido a maior geração dessas espécies e o aumento observado na atividade da catalase deve ser uma tentativa de sobrevivência pelas células. Além disso, vimos uma notável redução do potencial migratório e de formação de colônias nestas mesmas células, o que sugere que a BBR pode ser de grande valia na prevenção da progressão da doença já estabelecida. Portanto a BBR tem potencial para o tratamento do neuroblastoma.

Esse estudo é importante uma vez que os casos de neuroblastoma de alto risco não tem tratamento eficiente e levam muitas pessoas a morte, sobretudo crianças. Assim, a BBR pode ser vista como uma alternativa para o tratamento da doença, especialmente se considerarmos que ela pode ser utilizada em combinações com tratamentos já em uso. Para confirmar a eficiência dessas combinações mais estudos devem ser realizados. Adicionalmente, outros estudos que investiguem sua atividade *in vivo*, bem como seus mecanismos, são necessários uma vez que efeitos observados em estudos *in vitro* são distantes e podem variar em relação aos efeitos provocados no complexo ambiente tumoral real. É interessante ressaltar também a necessidade de estudos sobre a segurança e possíveis efeitos colaterais da BBR, em especial sobre células nervosas, uma vez que (1) o neuroblastoma é derivado de células imaturas do sistema nervoso periférico e (2) tratamentos que causem danos a células nervosas saudáveis podem ser danosos ao organismo.

REFERÊNCIAS

- American Cancer Society. **Neuroblastoma**. 2016. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html>>. Acesso em: 27 fev. 2017
- BELTRAN, H. The N-myc Oncogene: Maximizing its Targets, Regulation, and Therapeutic Potential. **Molecular cancer research**, v. 12, p. 815-820, 2014.
- BHUTADA, P., et al. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. **Behavioural Brain Research**, v. 220, p. 30–41, 2011.
- CARDACI, S., et al. Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 2115–2125, 2012.
- CARTER, D.R., et al. Glutathione biosynthesis is upregulated at the initiation of MYCN-driven neuroblastoma tumorigenesis, **Molecular Oncology**, 2016.
- CASÁS-SELVES, M.; DEGREGORI, J. How Cancer Shapes Evolution and How Evolution Shapes Cancer. **Evolution: Education and Outreach**, v. 4, p. 624–634, 2011.
- CHEUNG, N. V. DYER, M. A. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p. 397-411, 2013.
- COHEN L. E., et al. Late effects in children treated with intensive multimodal therapy for high-risk neuroblastoma: High incidence of endocrine and growth problems. **Bone Marrow Transplantation**, v. 49, 502–508, 2014.
- COHN S. L., et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 289-297, 2009.
- CONCANNON, C. G., et al. AMP kinase–mediated activation of the BH3-only protein Bim couples energy depletion to stress-induced apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v. 189, p. 83–94, 2010.
- CONKLIN, K. A. Cancer Chemotherapy and Antioxidants. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3201S–3204S, 2004.
- DASGUPTA, A., et al. Cancer’s Achilles’ Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. **International Journal Molecular Science**, 2017.
- DAVIDOFF, M. A. Neuroblastoma. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 21, p. 2-14, 2012.
- DEISSEROTH, A.; DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role. **Physiological Reviews**, v. 50, p. 319-375, 1970.

ERMELING B. M., et al. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 1386–1391, 2009.

HAN, Y., et al. Redox Regulation of the AMP-Activated Protein Kinase. **Plosone**, 2010.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARHAJI-TRAJKOVIC, L., et al. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, p. 3644-3654, 2009.

HERO, B., et al. Localized Infant Neuroblastomas Often Show Spontaneous Regression: Results of the Prospective Trials NB95-S and NB97. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 1504-1510, 2008.

HOLZEROVÁ, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 63, p. 16–20, 2015.

HUANG, M.; WEISS, W. A. Neuroblastoma and MYCN. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2013.

HUANG, X., et al. Important role of the LKB1–AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. **Biochemical Journal**, v. 412, p. 211–221, 2008.

HUBER K. Segregation of neuronal and neuroendocrine differentiation in the sympathoadrenal lineage. **Cell and Tissue Research**, v. 359, p. 333–341, 2015.

HU, H., et al. Set9, NF- κ B, and microRNA-21 mediate berberine-induced apoptosis of human multiple myeloma cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, p. 157–166, 2013.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2015.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, p. 347–354, 1997.

JEONG H. W., et al. Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 296, p. E955–E964, 2009.

JIN, Y.; KHADKA, D. B.; CHO W-J. Pharmacological effects of berberine and its derivatives: A patent update. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 2016.

JONES, R. G., et al. AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. **Molecular Cell**, v. 18, p. 283–293, 2005.

KIM, J. S., et al. Berberine induces FasL-related apoptosis through p38 activation in KB human oral cancer cells. **Oncology reports** v. 33, p. 1775-1782, 2015.

KIM, H., et al. Berberine-induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 385–394, 2012.

KUMAR, B., et al. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. **Cancer Research**, v. 68, p. 1777–1785, 2008.

LAVIN, M. F.; GUEVEN, N. The complexity of p53 stabilization and activation. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 941–950, 2006.

LAW, M. J. et al. ATR-X syndrome protein targets tandemrepeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. **Cell**, v. 143, p. 367–378, 2010.

LEI, X. G., et al. paradoxical roles of antioxidant Enzymes: basic mechanisms and health implications. **Physiological Rev**, v. 96, p. 307–364, 2016.

LIU, X., et al. Berberine Inhibits Invasion and Metastasis of Colorectal Cancer Cells via COX-2/PGE2 Mediated JAK2/STAT3 Signaling Pathway. **Plosone**, 2015.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 1957-1997, 2011.

MITTAL, A.; TABASUM, S.; SINGH, R. P. Berberine in combination with doxorubicin suppresses growth of murine melanoma B16F10 cells in culture and xenograft. **Phytomedicine**, v. 21, p. 340–347, 2014.

MOLENAAR, J. J. et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. **Nature**, 483, p. 589-595, 2012.

MONAMI, M., et al. Metformin and Cancer Occurrence in Insulin-Treated Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes Care**, v. 34, p.129–131, 2011.

MONCLAIR, T., et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 27, 2009.

MOSSÉ, Y. P. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. **Nature**, v. 455, p. 930-936, 2008.

MOUNIER, R. et al. Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. **Cell Press**, 2015.

MUELLER, S.; MATTHAY, K. K. Neuroblastoma: biology and staging. **Current Oncology Reports**, v. 11, p.431–438, 2009.

NAIR, S. K.; BURLEY, S. K. X-Ray Structures of Myc-Max and Mad-Max Recognizing DNA: Molecular Bases of Regulation by Proto-Oncogenic Transcription Factors. **Cell**, v. 112, p. 193-205, 2003.

PANI, G.; GALEOTTI, T.; CHIARUG, P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, p. 351–378, 2010.

SCHÄFER, H.; WINK, M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 1684–1703, 2009.

SINGH, I. P.; MAHAJAN, S. Berberine and its derivatives: a patent review (2009 - 2012). **Expert Opin. Ther. Patents**, v. 23, p. 215-231, 2013.

SHIRWAIKAR, A., et al. In Vitro Antioxidant Studies on the Benzyl Tetra Isoquinoline Alkaloid Berberine. **Biological and Pharmacological Bulletin**, v. 29, p. 1906-1910, 2006.

SHTUKMASTER, S., et al. Sympathetic neurons and chromaffin cells share a common progenitor in the neural crest in vivo. **Neural Development**, 2013.

SMITH, L., et al. Neuroblastoma in an Adult: Case Presentation and Literature Review. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 43, p. 81-84, 2013.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, p. 719-724, 2009.

SUN, N., et al. Rational Design of Berberine-Based FtsZ Inhibitors with Broad-Spectrum Antibacterial Activity. **Plosone**, 2014.

SUN, Y., et al. P53 is required for Doxorubicin-induced apoptosis via the TGF-beta signaling pathway in osteosarcoma-derived cells. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, p. 114–125, 2016.

TANG, J. et al. Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 5-17, 2009.

TRACHOOTHAM, D., et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS mediated mechanism by b-phenylethyl isothiocyanate. **Cancer Cell**, v. 10, p. 241–252, 2006.

TONG, L., et al. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 367, p. 18–25, 2015.

TOWLER, M. C.; HARDIE, D. G. AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. **Circulation research**, 2006.

VAZQUEZ, A. et al. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. **Drug Discovery**, p. 979 – 987, 2008.

VOGELSTEIN, B. Cancer: a deadly inheritance. **Nature**, v. 348, p. 681-682, 1990.

WANG, W.; GUAN K.-L. AMP-activated protein kinase and cancer. **Acta Physiologica**, v. 196, p. 55-63, 2009.

WELCH, D. R. Tumor Heterogeneity—A 'Contemporary Concept' Founded on Historical Insights and Predictions. **Cancer Research**, v. 76, p. 4-6, 2016.

WU, H.L., et al. Berberine inhibits the proliferation of human uterine leiomyoma cells. **Fertility and Sterility**, v. 103, p. 1098-1106, 2015.

XIE, J., et al. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. **Tumor Biology**, v. 36, p. 1279–1288, 2015.

YU, R. et al. Berberine-induced apoptotic and autophagic death of HepG2 cells requires AMPK activation. **Cancer Cell International**, 2014.

YUAN, Z., et al. TATA boxes in gene transcription and poly (A) tails in mRNA stability: New perspective on the effects of berberine. **Scientific reports**, 2015.

ZAKIKHANI, M. et al. Metformin Is an AMP Kinase–Dependent Growth Inhibitor for Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 66, p. 10269-10273, 2006.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 337–349, 2002.

ZHAO, L., et al. Berberine Improves Kidney Function in Diabetic Mice via AMPK Activation. **Plosone**, 2014.

ZHANG, L. et al. Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 452-465, 2015.

ZIECH, D. et al. Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 711, p. 167–173, 2011.