Irwin Alexander Patiño Linares

Estudos citotóxicos de moléculas antitumorais e antiparasitárias em células de câncer de fígado (HepG2) e de fibroblasto de hamster (V79-4).

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos
2013

Dedico este trabalho a minha família que a
fonte da minha alegria...

A Deus por toda sua misericórdia e
sabedoria que colocou em mim e que sempre
me levantou da tristeza...

Meu pai pelos conselhos e amor que tem
para mim...

Minha mãe pelo seu imenso amor e ternura...

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e a oportunidade de estudar e ser uma pessoa de bem. Muito obrigado Deus pela família que tenho meu pai (Adolfo Patiño) e minha mãe (Maria Cristina Linares), duas pessoas maravilhosas que apesar de suas diferenças sempre foram pais exemplares para seus filhos.

Agradeço a minha tia, Stella Linares, pela sua ajuda econômica que recebi quando estava na faculdade e pelo seu ânimo de sair adiante como uma pessoa integral.

Agradeço ao professor Andrei Leitão pela sua aceitação no seu grupo de investigação e por toda sua informação que deu para mim com o âmbito de crescer como Profissional. Além disso, foi um amigo, um conselheiro e uma pessoa que me apoiou nos momentos difíceis.

Agradeço à professora Janice Rodrigues pelos seus conhecimentos e sua amizade.

Agradeço ao Instituto de Química de São Carlos pelas instalações onde foi desenvolvido o projeto de mestrado.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida, já que foi muito importante para a moradia em São Carlos.

Agradeço aos meus colegas colombianos pelas suas conversas e ter tempos de diversão durante estes dois anos.

Agradeço a minha namorada (Sandra Ribeiro) pelo seu amor que tem para mim. Por toda sua ajuda e colaboração que me brindou em aqueles momentos de estresse e desespero.

Muito obrigado a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram nestes dois anos de mestrado.

RESUMO

Os ensaios celulares têm ganhado relevância na gênese planejada de fármacos, devido a sua utilização nas diversas etapas envolvidas neste processo. Estes ensaios envolvem a caracterização da atividade farmacológica, propriedades farmacocinéticas e atividade tóxica para compreender a atividade biológica das moléculas de interesse. Neste trabalho, os ensaios celulares foram usados para identificar a atividade anticancerígena e a atividade tóxica de moléculas, uma vez que a morte celular é o parâmetro avaliado em ambos os casos. No presente estudo foram avaliados 34 compostos, sendo dezessete moléculas do grupo NEQUIMED, determinando-se sua atividade citotóxica na célula neoplásica de fígado (HepG2) e na célula de fibroblasto (V79-4). A determinação da atividade citotóxica dos compostos bioativos foi realizada por o método colorimétrico de triagem envolvendo o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que é metabolizado pela mitocôndria da célula viva, com confirmação da atividade biológica realizada por citometria de fluxo para a linhagem de fibroblasto. As triagens iniciais foram estabelecidas para determinar a atividade biológica, sendo que as moléculas Neq256, Neq385 e Neq388 apresentaram atividade citotóxica frente à célula HepG2 (caracterizando assim a atividade anticancerígena), enquanto que Neq385 apresentou seletividade em relação a atividade nas células de fibroblasto. Dentre as moléculas de referência, YM-155 apresentou os melhores resultados de atividade citotóxica com IC_{50} (HepG2) de $0,094 \mu\text{mol L}^{-1}$ e IC_{50} (V79-4) $> 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo muito seletiva para a linhagem cancerígena. Os resultados demonstraram que as moléculas Neq265, Neq385 e Neq388 são promissoras e serão usadas para o planejamento de modificações estruturais que visa obter moléculas com maior potência e seletividade frente às células cancerígenas. Outra vertente do trabalho envolve o planejamento de inibidores da survivina, que apresentam grande potencial para a descoberta e desenvolvimento de estratégias quimioterápicas seletivas.

Palavras-chave: química medicinal, ensaios celulares, atividade anticancerígena, citotoxicidade.

Abstract

Cell-based assays are gaining relevance in the drug discovery and development area, being in use almost throughout the whole process. These assays are applied to characterize the pharmacological, pharmacokinetic and toxic activities of new molecules. In this work, cell-based assays were performed to identify anticancer and toxic activities of novel compounds, once the cell death process is the parameter that was evaluated in both cases. In this work, 34 compounds were evaluated (17 of them from the NEQUIMED database) in which the cytotoxic activity in liver cancer cells (HepG2) and hamster fibroblast cells (V79-4) were determined by means of the MTT colorimetric screening. The biological activity in fibroblast cells was further confirmed by using flow cytometry. Out of the whole set, molecules Neq256, Neq385 e Neq388 were cytotoxic to HepG2 (having anticancer activity). Neq385 was selective towards the liver hepatocellular carcinoma when compared with the fibroblasts. Among the reference compounds, YM-155 was the most selective and potent anticancer molecule: IC_{50} (HepG2) $0.094 \mu\text{mol L}^{-1}$ and IC_{50} (V79-4) $> 100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Taken together, these results provide promising new molecules (Neq265, Neq385 e Neq388) for further optimization of the potency and selectivity using drug design. Another important outcome for further exploration is the design of survivin inhibitors bearing a huge potential for novel selective chemotherapeutic approaches.

Keywords: medicinal chemistry, cell-based assays, anticancer activity, cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Etapas de descoberta e desenvolvimento de um fármaco.....	2
Figura 2 - Ensaios celulares com culturas 2D e 3D que mimetizam funções fisiológicas ou patológicas	4
Figura 3 - Estruturas químicas de sais de tetrazólio	6
Figura 4 - Reação de metabolismo do MTT pela redutase mitocondrial na célula	7
Figura 5 - Características morfológicas de apoptose e necrose.	10
Figura 6 – As fases do ciclo celular.....	11
Figura 7 – Morfologia das duas linhagens celular V79-4 e HepG2.	16
Figura 8 – Diagrama de preparação dos ensaios celulares para as linhagens V79-4 e HepG2	19
Figura 9 – Curva de crescimento das células HepG2 e V79-4	22
Figura 10 – Porcentagem de viabilidade celular nas linhagens HepG2 e V79-4 para o DMSO	24
Figura 11 – Viabilidade celular dos compostos $K_2Cr_2O_7$, azul de tripan, <i>p</i> -nitrofenol e SDS para a célula V79-4	25
Figura 12 – Viabilidade celular dos compostos Acrilamida, Imidazol, Glicose e Triton X-100 para a célula V79-4	26
Figura 13 – Viabilidade celular dos compostos 1,4-Dioxano, DMSO e Etanol na linhagem celular V79-4	26
Figura 14 - Viabilidade celular dos compostos $K_2Cr_2O_7$, azul de tripan, <i>p</i> -nitrofenol e SDS para a célula HepG2	27
Figura 15 – Viabilidade celular dos compostos Acrilamida, Imidazol, Glicose e Triton X-100 para a célula HepG2	28
Figura 16 – Viabilidade celular dos compostos 1,4-Dioxano, DMSO e Etanol na linhagem celular HepG2	28
Figura 17 – Comparação da viabilidade celular nas duas linhagens para a doxorrubicina	29
Figura 18 – Curva dose-reposta para os compostos Acrilamida, imidazol, <i>p</i> -nitrofenol, $K_2Cr_2O_7$ e Doxorrubicina, na linhagem celular HepG2	30
Figura 19 – Curva dose-reposta para os compostos Acrilamida, imidazol, <i>p</i> -nitrofenol, $K_2Cr_2O_7$ e Doxorrubicina, na linhagem celular V79-4.....	31
Figura 20 – Padrão estrutural de compostos inibidores de quinases identificado nas moléculas NEQUIMED	32
Figura 21 – Moléculas NEQUIMED selecionadas para os testes <i>in vitro</i>	34
Figura 22 – Triagem de viabilidade das células V79-4 para os compostos Neq265, 09, 255, 256, 257 e 258	37
Figura 23 - Triagem de viabilidade das células V79-4 para os compostos Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264	38
Figura 24 - Triagem de viabilidade das células V79-4 para os compostos Neq385, 387, 388, 389 e 391	40
Figura 25 – Triagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq265, 09, 255, 256, 257 e 258	42
Figura 26 - Triagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264	43

Figura 27 - Triagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq385, 387, 388, 389 e 391	45
Figura 28 – Estrutura química das moléculas antitumorais e antiparasitária	46
Figura 29 – Comparação dos valores de viabilidade da célula V79-4 para os compostos antitumorais e antiparasitário	48
Figura 30 – Comparação dos valores de viabilidade da célula HepG2 para os compostos antitumorais e antiparasitário.....	50
Figura 31 – Curva de dose-resposta para a molécula YM-155 nas linhagens celulares V79-4 e HepG2	51
Figura 32 – Comparação das curvas de dose-resposta das molécula YM-155 e doxorrubicina na linhagem celular V79-4	52
Figura 33 – Comparação das curvas de dose-resposta das molécula YM-155 e doxorrubicina na linhagem celular HepG2.....	53
Figura 34 - Viabilidade celular do composto YM-155 frente ao tempo de incubação para cada concentração selecionada na célula HepG2.....	54
Figura 35 - Viabilidade celular da doxorrubicina frente ao tempo de incubação para cada concentração selecionada na célula tumoral HepG2	55
Figura 36 – Padrão celular normal na linhagem V79-4	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista dos compostos selecionados para os ensaios celulares <i>in vitro</i>	22
Tabela 2 – Comparação da viabilidade celular dos compostos dicromato de potássio, <i>p</i> -nitrofenol e SDS	27
Tabela 3 – Valores de IC ₅₀ dos compostos selecionados na linhagem celular HepG2	31
Tabela 4 – Valores de IC ₅₀ dos compostos selecionados para a linhagem celular V79-4	32
Tabela 5 – Porcentagem de viabilidade de células V79-4 para os compostos Neq265, 09, 255, 256, 257 e 258.....	36
Tabela 6 – Porcentagem de viabilidade das células V79-4 para os compostos Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264.....	38
Tabela 7 – Porcentagem de viabilidade de células V79-4 para os compostos Neq385, 387, 388, 389 e 391	39
Tabela 8 – Porcentagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq265, 09, 255, 256, 257 e 258.....	41
Tabela 9 – Porcentagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264.....	43
Tabela 10 – Porcentagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq385, 387, 388, 389 e 391	44
Tabela 11 – Porcentagem de viabilidade da célula V79-4 para os compostos antitumorais e antiparasitário	48
Tabela 12 – Porcentagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos antitumorais e antiparasitário	49
Tabela 13 – Valores de viabilidade celular do composto YM-155 na célula HepG2 após 24, 48 e 72 horas	53
Tabela 14 - Valores de viabilidade celular da doxorrubicina na célula tumoral HepG2 após 24, 48 e 72 horas de incubação	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxidez
AR	receptor andrógeno
ATP	adenosina trifosfato
Cdks	quinases dependentes de ciclinas
CHC	carcinoma hepatocelular
Cyc	ciclinas
DMEM	Meio Eagle modificado pela Dubelcco
DNA	ácido desoxirribonucleico
HBV	vírus da hepatite B
HTS	ensaio em massa
IAP	proteína inibidora da apoptose
IC ₅₀	concentração de substância necessária para inibir a atividade biológica em 50 %
IFF	interação fármaco-fármaco
mTOR	proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NIH	Institutos Nacionais da Saúde (<i>National Institutes of Health</i> , EUA)
QSAR	relação quantitativa estrutura-atividade
SAR	relação estrutura-atividade
WST	sais de tetrazólio solúveis em água
XTT	2,3-bis-(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Descoberta e desenvolvimento de Fármacos	12
1.1.1	Características dos fármacos	3
1.2	Culturas de células.....	4
1.2.1	Ensaio colorimétrico	6
1.2.2	Ensaio celular.....	8
1.3	Morte celular.....	8
1.4	Ciclo Celular.....	10
1.5	Câncer	12
1.5.1	Classificação.....	12
1.6	Câncer Hepático	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivos específicos	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Reagentes.....	16
3.2	Cultura celular e preparação do meio	16
3.3	Passagem das duas linhagens celulares V79-4 e HepG2	17
3.4	Preparação dos compostos	17
3.5	Preparação dos ensaios celulares.....	18
3.6	Quantificação dos resultados por meio de ensaio dose-resposta	19
3.7	Preparação dos ensaios celulares de 24, 48 e 72 horas	19
3.8	Ensaio confirmatório por citometria de fluxo	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1	Estabelecimento da série de moléculas para teste	21
4.2	Análise da triagem dos compostos para a célula V79-4	24
4.3	Análise da Triagem dos compostos para a linhagem celular HepG2.....	26
4.4	Curvas de dose-resposta dos compostos nas linhagens celulares V79-4 e HepG2.....	30
4.5	Análises das triagens de viabilidade celular dos compostos com atividade antiparasitária .	32
4.5.1	Análises das triagens de viabilidade celular dos compostos com atividade antiparasitária para a linhagem celular V79-4.....	35

4.5.2	Análise das triagens de viabilidade celular dos compostos com atividade antiparasitária para a linhagem celular HepG2	40
4.5.3	Análise da triagem dos compostos antitumorais nas células V79-4 e HepG2	45
4.5.4	Curvas dose-resposta para a YM-155	51
4.6	Avaliação da citotoxicidade da YM-155 na célula neoplásica em período de incubação de 24, 48 e 72 horas.....	53
4.7	Confirmação da atividade biológica em células V79-4 por citometria de fluxo.....	56
5	CONCLUSÕES	58
6	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da química medicinal é a concepção e descoberta de novos compostos bioativos que poderão ser desenvolvidos até se tornarem fármacos. Este processo envolve uma equipe de pesquisadores de uma ampla gama de disciplinas como química, biologia, bioquímica, farmacologia, medicina e informática, dentre outros¹. A descoberta ou concepção de uma molécula não só exige um processo de descoberta ou planejamento, mas também a síntese, o desenvolvimento de testes e procedimentos para determinar a forma como opera no sistema biológico e uma avaliação de segurança.²

A descoberta de moléculas bioativas também pode exigir uma investigação fundamental sobre a natureza biológica e química do estado da doença. Portanto, nem todos os compostos ativos biologicamente têm as propriedades físico-químicas desejadas para se tornarem fármacos.³ Como exemplo pode-se tomar a administração *in vivo*, onde o composto ativo biologicamente pode ser muito lipofílico para ser oralmente absorvido, muito polar para cruzar a parede gastrointestinal ou pode ter uma funcionalidade química muito vulnerável que pode ser atacado por sistemas metabólicos no fígado, portanto, não permanecem intactos por tempo suficiente para ter um útil efeito *in vivo*.⁴ Como este é um problema multifacetado, a pesquisa e desenvolvimento de moléculas com interesse farmacológico dependem de várias áreas de conhecimento.

1.1 Descoberta e desenvolvimento de Fármacos

A gênese planejada de novas moléculas bioativas de interesse farmacológico envolve múltiplas etapas, onde uma grande gama de estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* é aplicada para as diversas fases de descoberta e desenvolvimento. Inicialmente, uma grande quantidade de moléculas é reduzida a alguns milhares por meio das triagens computacionais em estudos *in silico*. Somente algumas dessas moléculas que potencialmente interagem com o alvo biológico são testadas durante os estudos enzimáticos e celulares (Figura 1). A consequente identificação de alguns esqueletos químicos contidos nas moléculas de interesse poderá resultar na seleção de estruturas moleculares denominadas protótipos. Essas estruturas moleculares

serão modificadas a partir de estudos de relação estrutura-atividade qualitativa (SAR) ou quantitativa (QSAR) envolvendo diversos estudos pre-clínicos *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente, estudos clínicos serão realizados sob a observação do ente regulador que estabelece as condições para desenvolver os ensaios dessa natureza. Finalmente, após realização dos ensaios clínicos (fase I, II e III) e demonstração adequada de dosagem e segurança, a molécula em estudo, será aprovada pelo órgão regulador para sua comercialização.⁵

Figura 1 - Etapas de descoberta e desenvolvimento de um fármaco.

Fonte: da Rocha, J. R. Planejamento de Inibidores das Enzimas Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase e Diidroorotato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. (2010). **Tese (Doutorado)** - Doutorado em Ciências - área de concentração: Físico-Química - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010

Estima-se que, em média, um composto matriz é obtido a cada 10.000 moléculas, que levará entre 10 a 15 anos antes de qualquer produto final possa chegar ao mercado. Não é surpreendente que a maioria dos medicamentos avaliados atualmente tenha sido desenvolvida há 20 ou 40 anos atrás.

1.1.1 Características dos fármacos

A tendência de novos fármacos é exibir uma grande variação nos perfis farmacocinéticos e ser sensíveis nas interações fármaco-fármaco, na qual, são as principais preocupações quando se está desenvolvendo o fármaco. Portanto, os fatores para determinar as características farmacocinéticas de um composto deveriam ser descritas no processo de descoberta do fármaco. Transportadores de membrana são hoje reconhecidos como o principal determinante da variabilidade farmacocinética de certos fármacos, além de enzimas metabolizadoras de fármacos.⁶ Porém, na descoberta e no processo de desenvolvimento de novas entidades químicas, ambos os processos de captação e liberação devem ser caracterizados em paralelo com o metabolismo potencial de candidatos a fármacos. Tais estudos requerem modelos *in vitro* para predições confiáveis de absorção hepática, distribuição, metabolismo, excreção e toxidez (ADMET) dos fármacos durante os testes pré-clínicos.

É necessário estudar a atividade tóxica das novas moléculas bioativas desde o início dos estudos, uma vez que este é um dos maiores entraves para o desenvolvimento de novos compostos bioativos. Os ensaios celulares apresentam grande relevância neste contexto,⁷ especialmente quando se considera a possibilidade de usar estudos *in vitro* para substituir os ensaios *in vivo* estabelecidos atualmente (Figura 2).⁸ Apesar dos rigorosos testes *in vivo*, 23% dos medicamentos registrados estão retirados do mercado devido a reações adversas imprevistas.⁹ Os motivos para a dificuldade da aprovação dos fármacos no último estágio incluem interações fármaco-fármaco (IFF) e efeitos adversos, o que demonstra a necessidade de uma adequada caracterização da atividade tóxica nas moléculas em desenvolvimento.¹⁰

A utilização de ensaios em células pelas indústrias farmacêuticas e testes de citotoxicidade encontra-se em uma crescente nos últimos anos.^{11,12} Os ensaios de toxicidade *in vitro*¹³ têm sido muito úteis para reduzir os custos associados à análise de um grande número de compostos bioativos, constituindo uma alternativa aos testes em animais,¹⁴ a partir da correlação com dados de toxicidade *in vivo*. Para uma avaliação rápida da citotoxicidade, as triagens *in vitro* podem ser usadas para identificar aspectos gerais de toxicidade celular através de ensaios em massa (HTS).^{15, 16} Estes ensaios podem ser usados tanto para identificar moléculas

potencialmente tóxicas ao organismo, quanto para caracterizar a atividade de compostos anticancerígenos, pois ambos levam à inibição da multiplicação celular.

Figura 2 - Ensaio celulares com culturas 2D e 3D que mimetizam funções fisiológicas ou patológicas

Fonte: TRALAU, T. Drug-mediated toxicity: illuminating the 'bad' in the test tube by means of cellular assays? Trends in Pharmacological Sciences, v. 33, n. 7, p. 353-364, 2012.

1.2 Culturas de células

O cultivo de células se iniciou no princípio do século XX com Harrison, em 1907,¹⁷ e Carrel, em 1912.¹⁸ Essa técnica foi desenvolvida como um método para

estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em ambiente controlado. Os primeiros experimentos consistiam em cultivo de tecidos fragmentados mecanicamente em frascos contendo fluidos dos animais de onde provinham os tecidos. Devido a essa forma de cultivo, durante mais de 50 anos essa técnica foi chamada cultivo de tecidos, sendo esse termo atualmente usado genericamente para denominar tanto o cultivo de células quanto o de tecidos e de órgãos.¹⁹

Em 1951, George Gey cultivou células de tecido tumoral humano estabelecendo a linhagem HeLa, utilizada até hoje em todo o mundo.²⁰ O fato de que tumores humanos poderiam dar origem a células contínuas em linhagem aumentou o interesse pelo cultivo de tecidos. A cultura de tecidos tornou-se amplamente usada por causa da introdução dos antibióticos, o que facilitou o longo prazo de propagação da linhagem celular, embora muitos alertas contra seu uso contínuo e o risco associado de selecionar micro-organismos resistentes a antibióticos. O desenvolvimento de cultura de células deve sua importância a dois ramos importante da medicina: a produção de vacinas antivirais e a compreensão da neoplasia. A padronização das condições e das linhagens celulares para produção e ensaios de vírus, é sem dúvida, um ímpeto para o desenvolvimento da tecnologia de cultura de células, particularmente para a produção de um grande número de células para análise molecular e bioquímica.²¹

A maioria dos ensaios celulares é realizada em placas multipoços que pode ser facilmente miniaturizada para testar milhares de compostos por dia utilizando sistemas automáticos. No entanto, há um crescente interesse em avaliar os efeitos dos fármacos em período de tempo mais longo, estudando as interações entre os diferentes tipos de células em sistemas biológicos semelhantes ao animal.²² Os ensaios celulares baseados em culturas de células 2D são largamente utilizados para a seleção de fármacos devido a seu baixo custo e fácil operação. No entanto, as culturas de células 2D podem ter erros na predição de resposta tecido específico devido à perda da morfologia nativa e limite das interações célula-célula e célula-matriz. É conhecido que as células que crescem em uma superfície 2D têm um comportamento diferenciado das células que se desenvolvem em uma cultura 3D ou em um tecido *in vivo*, com características morfológicas específicas, interação célula-matriz e diferenciação.²³

1.2.1 Ensaios colorimétricos

Os ensaios colorimétricos são muito utilizados para triagens iniciais de moléculas bioativas, pois permite quantificação fácil e rápida da resposta celular. Nestes ensaios utilizam-se compostos que alteram de cor ao serem metabolizados na célula, ou tendem a se acumular nas células vivas. Em 1983 Mosmann desenvolveu um método colorimétrico para determinar a proliferação celular e citotoxicidade em células,²⁴ graças a isso, na atualidade é uma das ferramentas mais utilizadas para a determinação da viabilidade celular e crescimento celular.²⁵ A detecção da viabilidade celular é usualmente empregada para identificar a citotoxicidade de uma molécula em ensaios HTS, sendo muito utilizados métodos colorimétricos com um sal de tetrazólio (MTT, XTT²⁶, MTS²⁷, WST), vermelho neutro, ou outro composto (Figura 3).

Figura 3 - Estruturas químicas de sais de tetrazólio

O MTT quando metabolizado leva a formação de cristais de formazan, que são insolúveis em meio aquoso. A grande maioria de aplicações celulares com sais de tetrazólio envolve ensaios em placas de noventa e seis (96) poços que determina a proliferação celular, onde a quantidade do composto de tetrazólio reduzido pela célula é proporcional ao número de células viáveis na fase de crescimento exponencial.²⁸ Embora seja uma boa aproximação para definir as condições de crescimento com um tipo particular de células (média) ao longo do ciclo celular, os problemas surgem frequentemente quando as condições de crescimento não são ideais ou quando agentes modificadores do crescimento são utilizados.²⁹

Os sais de tetrazólio possuem um anel de tetrazol quaternário que tem uma carga positiva sobre uns dos átomos de nitrogênio. Esta estrutura central está ligada

a três grupos aromáticos, em sua maioria grupos fenílicos. Após a redução, a estrutura do tetrazólio se transforma de sais incolores ou fracamente coloridos em produtos brilhantes de formazan devido à ruptura do anel de tetrazol. Diferentes compostos tetrazólicos, como o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) têm sido estudados para determinar suas propriedades físico-químicas e biológicas.³⁰

O sal de tetrazólio é reduzido pela membrana mitocondrial da célula viva, onde o anel heteroaromático é clivado pela succinato-tetrazólio reductase pertencente à cadeia respiratória mitocondrial e é ativo somente nas células vivas, (Figura 4).

Figura 4 - Reação de metabolismo do MTT pela redutase mitocondrial na célula

Recentes estudos mostraram que a redução do MTT é devida à oxidação dos cofatores de piridina nucleotídeo NADH e NADPH. Além disso, a redução do MTT está associada não só com as mitocôndrias, mas também com o citoplasma e com membranas não mitocondriais, incluindo o compartimento endossomo/lisossomo e a membrana plasmática. A captação celular do MTT via potencial de membrana e a consequente redução intracelular explica prontamente os resultados do MTT. A forma como o MTT entra nas células viáveis e é reduzido intracelularmente é relatado em estudos feitos em células HepG2.^{31,32}

1.2.2 Ensaios celulares

A descoberta de fármacos é complexa, leva muito tempo e tem um alto custo econômico. Estima-se que são necessários 10-12 anos para desenvolver um medicamento, com um custo de 780 milhões de dólares.³³ Os testes realizados em animais trazem uma grande quantidade de informação, mas têm uma desvantagem no seu investimento, no seu rendimento e críticas morais. Graças às novas pesquisas sobre genômica, tem-se um grande conhecimento sobre o comportamento das proteínas que podem atuar com alvos biológicos em diferentes doenças. Isto estimulou o desenvolvimento de ensaios HTS (*high-throughput screening*) pois são métodos rápidos para as triagens iniciais de moléculas bioativas.³⁴

Os ensaios por HTS podem ser classificados em dois tipos: ensaios bioquímicos e ensaios baseados em células. Os ensaios bioquímicos são principalmente de inibição enzimática (cinases,³⁵ proteases,³⁶ transferases³⁷) ou de interação ligante-receptor, como receptores acoplados à proteína G.³⁸ Além de problemas com pureza do alvo macromolecular, a resposta ao composto não representa exatamente uma resposta específica no tecido já que a atividade de uma molécula pequena num ensaio bioquímico é diferente da atividade a nível celular. Portanto, os ensaios celulares podem ser aplicados como uma alternativa aos ensaios bioquímicos, ou como complementares a este.

Os ensaios celulares têm uma grande importância para a identificação de moduladores com diversos mecanismos de ação, assim como, proporcionar informação dos compostos em relação à permeabilidade celular, estabilidade, e citotoxicidade dos compostos.³⁹ Estes ensaios fornecem respostas similares às identificadas em tecidos representativos e têm sido usados na descoberta de fármacos, identificação e otimização do líder, segurança e atividade citotóxica seletiva.

1.3 Morte celular

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem. No desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte,

contribuindo para a formação dos órgãos e tecidos.⁴⁰ A morte celular desempenha uma parte crucial no desenvolvimento de animais e plantas, e normalmente continua na vida adulta. Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares.⁴¹

Apoptose, termo derivado do grego, que significa a queda das folhas das árvores no outono,⁴² é uma forma de morte celular que tem características morfológicas marcantes, que incluem condensação da cromatina e fragmentação nuclear, prolongamentos da membrana plasmática, onde estes prolongamentos da membrana celular provocam a formação de pequenos fragmentos denominados corpos apoptóticos (Figura 5). Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causarem um processo inflamatório.^{43,44} Outro mecanismo de morte celular é a necrose, um tipo de morte celular na qual as células sofrem uma transformação que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular (Figura 5).

Apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência⁶⁸, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados⁶⁹. O primeiro componente descrito do mecanismo molecular da morte celular em mamíferos foi à proteína Bcl-2⁷⁰, mas a primeira evidência da existência de um programa genético que mostrará a morte celular, obteve-se dos estudos realizados no nemátodo *Caenorhabditis elegans*^{68, 71}, onde acharam genes alterados em mutantes que chamaram de **ced** (cell death abnormal). Identificaram-se os genes ced-3 e ced-4 que ativavam o processo de morte celular e o gene ced-9 que o inibia. Se a celular expressava os três genes sobreviviam, mas se só expressava os dois primeiros, a célula morria por apoptose.

Figura 5 - Características morfológicas de apoptose e necrose.

Adaptado de <http://dc407.4shared.com/doc/6Lr-LwW7/preview.html> (acesso 2/7/2013)

1.4 Ciclo Celular

Uma célula se reproduz por mitose ao executar uma sequência organizada de eventos em que ela duplica seu conteúdo resultando duas células iguais. Este ciclo de duplicação e divisão, conhecido como ciclo celular, é um mecanismo importante para todos os seres vivos. Para que a célula possa produzir duas células-filhas geneticamente idênticas, o DNA de cada cromossomo deve ser replicado para produzir duas cópias iguais, e os cromossomos devem ser distribuídos nas células-filhas de forma que cada uma receba uma cópia de todo o conteúdo genético da célula parental.⁴⁵

O processo é dividido em quatro fases sequenciais que podem ser visualizadas na Figura 6. O ciclo se inicia na fase G1, onde a célula responde a sinais de crescimento, tanto positivos (fisiologicamente por meio de fatores de crescimento, ação hormonal, dentre outros), quanto negativos (por meio oncogenes, por exemplo). Este período é caracterizado pela transcrição de vários genes, levando a produção de proteínas necessárias que serão necessárias para as células filhas e também para a regulação da síntese de DNA. Na fase S ocorre a duplicação do

DNA, usando as proteínas produzidas na etapa anterior. A fase G2 inicia-se após a fase S e prepara a célula para entrada na mitose. Na última fase (M) ocorre a divisão em duas células filhas por mitose. Alguns autores nomeiam uma quinta fase (G0), também conhecida como fase quiescente, onde o ciclo se encontra parado, porém esta fase é reversível à fase G1, promovendo a continuidade do ciclo celular.^{46,47}

A proliferação celular é um processo altamente regulado em eucariotos, onde a maquinaria celular percebe a presença de fatores de crescimento ou fatores inibitórios, avançando ou interrompendo a progressão do ciclo, respectivamente. Diferentes pontos de checagem (*checkpoints*), presentes no ciclo celular são os responsáveis pela progressão ou parada do ciclo celular. Na figura 8 podemos observar alguns dos *checkpoints* e também o ponto de restrição “R”, onde a célula confere se todos os fatores necessários à replicação estão presentes e só então prossegue no ciclo celular.

Figura 6 – As fases do ciclo celular

Adaptado de http://pt.m.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Cell_Cycle_2.svg (acesso: 2/7/2013).

Normalmente, a progressão do ciclo celular em mamíferos é regulada pela ativação sequencial dos pares ciclinas (cyc) e quinases dependentes de ciclinas (Cdks). A atividade das Cdks é dependente da sua interação com seus reguladores, que são ciclinas específicas. A atividade dos vários complexos de ciclinas/Cdks é responsável pelo controle da progressão celular através de cada fase do ciclo.⁴⁸ A perda do controle do ciclo celular é um dos eventos responsáveis pelo aparecimento de células tumorais. Estas células podem ser modificadas como consequência de uma alteração da função das ciclinas/Cdks, superexpressão de oncogenes, anormalidade na função de fatores de crescimento e devido a mutações dos genes supressores tumorais.

1.5 Câncer

O câncer se desenvolve quando há uma desregulação na replicação de células em um local do corpo. Em um câncer sólido, as células malignas estão inicialmente localizadas em uma região, onde o grau de malignidade está relacionado à sua característica invasiva. Alguns tipos de células cancerosas podem se desprender do local de origem e migrarem para outras partes do corpo através do sistema circulatório sanguíneo ou dos vasos linfáticos (metástase), onde eles começam a crescer, constituindo a metástase.⁴⁹

A palavra câncer (do grego karkinos) foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates (460-370 a.c.), considerado o “pai da medicina”, para se referir a tumores formadores de úlceras. Atualmente, câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos.⁴⁹ Os agentes cancerígenos podem estar nos alimentos, na água, no ar e em produtos químicos e luz solar onde as pessoas ficam expostas.

1.5.1 Classificação

Quando as células não têm um controle na sua proliferação, elas podem formar tumores benignos ou malignos. Os tumores benignos são geralmente massas expansivas de crescimento lento que se comprimem em vez de invadirem tecidos

circundantes. Eles como tal, representam pouca ameaça, exceto quando crescem em espaços confinados como o crânio, e podem ser facilmente retirados. No entanto, muitos dos tumores classificados como benignos podem ter potencial maligno porque são formados em lugares de risco como o intestino grosso.⁵⁰

Os tumores malignos são geralmente de rápido crescimento, invadem tecidos circundantes e principalmente, colonizam órgãos distantes. A capacidade das células tumorais para separar a massa original (tumor primário) e estabelecer a metástase descontínua com o tumor primário é a prova inequívoca de um tumor maligno. Os tumores também são classificados de acordo com seu lugar de origem; o conhecimento do tecido parental num metástase linfonodal poderia estabelecer a localização de um tumor primário não diagnosticado até agora.⁵⁰

1.6 Câncer Hepático

Dentre as mais frequentes neoplasias malignas está o câncer hepático, representando a quinta maior incidência em homens e a oitava maior em mulheres. Em razão da alta mortalidade, esta patologia também representa, dentre as demais, a terceira principal causa de morte no mundo, com aproximadamente 630.000 novos caso anuais, e por isso, constitui um importante problema de saúde pública.^{51,52}

Sua incidência é maior em países pouco desenvolvidos e endêmicos para infecção do vírus da hepatite B, principalmente no continente Asiático, como China, Japão e Taiwan chegando a atingir 50% das causas de morte por câncer naqueles países. É também prevalente na África Subsaariana, onde representa 89% dos casos de câncer. Lugares com elevadas taxas de infecção pelo vírus da hepatite C, como Europa e América do Norte também apresentam elevado número de casos desta patologia.⁵³

As diferenças na incidência desta neoplasia devem-se também a outros importantes fatores como obesidade, diabetes e padrões dietéticos, características demográficas, estilo de vida, influências ambientais, uso de contraceptivos orais e sobrecarga de ferro.⁵⁴ Além destes, outros conhecidos fatores de risco são mais fortemente associados a um tipo específico de câncer hepático, o carcinoma hepatocelular (CHC); sendo eles o tabagismo, consumo excessivo de álcool, cirrose, exposição a comidas contaminadas com aflatoxinas, histórico familiar de carcinoma

hepatocelular e fatores virais (positividade para antígeno HbsAG). No entanto, estes fatores parecem atuar como cofatores na presença de infecção viral crônica.^{55,56}

A íntima relação entre a infecção por vírus da Hepatite B (HBV) e hepatocarcinoma celular foi primeiramente relatada em 1975, sendo atualmente reconhecido como principal fator responsável pelo desenvolvimento desta doença. Hoje, estima-se que 350 a 400 milhões de pessoas estão infectadas cronicamente com este vírus em todo o mundo e que desse número, um quarto irá desenvolver CHC.⁵⁶ O CHC por sua vez, é responsável por meio milhão de mortes anuais em todo o mundo.⁵⁷

O CHC acomete células do parênquima hepático, os hepatócitos, originando-se no próprio órgão, sendo por isto caracterizado como um câncer primário (GISH, 2010; American Cancer Society). É resultado de mutações acumulativas em hepatócitos já maduros, estimulados por fatores externos, resultando em desregulada proliferação, morte celular ou produção de populações de células monoclonais, que podem formar nódulos e evoluir para tumor. Pode ainda ter origem a partir de células embrionárias. No entanto, o mecanismo pelo qual esse tumor desempenha sua patogênese é muito complexo e ainda desconhecido, visto a heterogeneidade desse câncer e a complexidade das funções desempenhadas pelos hepatócitos.⁵⁸

Neste trabalho, dois tipos de linhagens celulares foram usadas: HepG2 (provenientes de câncer de fígado) e a V79-4 (fibroblasto de Hamster) para determinar vários parâmetros relacionados à viabilidade e morte celular, usados para quantificar a citotoxicidade de diferentes compostos estudados no Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED). Portanto, os ensaios realizados são de grande valia na elucidação de moléculas citotóxicas, seja como anticancerígeno (com inibição do crescimento das células de câncer de fígado) ou com potencial atividade tóxica (por meio do uso de fibroblasto).

2 OBJETIVOS

- Avaliar o perfil biológico dos compostos de interesse que possuem atividade antitumoral e/ou antiparasitária do NEQUIMED, essencial ao estudo e seleção das melhores estruturas químicas. Para tal, foram realizados os ensaios citotóxicos das moléculas para detectar a viabilidade de células provenientes do câncer de fígado e de fibroblasto.

2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer um método de triagem rápido para o estudo de moléculas bioativas por meio de análise colorimétrica por MTT que detecta a viabilidade celular.
- Selecionar uma série de moléculas promissoras a partir da análise dos resultados do método de triagem para que estudos mais aprofundados sejam realizados.
- Realizar estudos mais longos para determinar a atividade das moléculas bioativas nas duas linhagens celulares após 24, 48 e 72 horas.
- Realizar estudos confirmatórios sobre a morte celular usando citometria de fluxo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O MTT, soro fetal bovino (FBS), acrilamida, imidazol, 1,4-dioxano, triton x-100, p-nitrofenol, bicarbonato de sódio, dimetilsulfoxido (DMSO) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. O álcool etílico e o dicromato de potássio foram obtidos do LabSynth Produtos para Laboratório Ltda (Diadema-SP). A glicose foi adquirida da GibcoBRL Life Technologies.

3.2 Cultura celular e preparação do meio

As células HepG2 (proveniente de câncer de fígado) e V79-4 (fibroblasto de Hamster) foram obtidas no banco de células do Rio de Janeiro BCRJ/UFRJ. Todas as células foram cultivadas em meio com 10 % de soro fetal bovino (FBS) a 37 °C em um frasco de cultura (75 cm²), em uma atmosfera com 5 % de CO₂ em um pH entre 7,2-7,4, cujo meio foi trocado a cada dois dias. Morfologicamente, as duas linhagens apresentam características bem distintas, conforme visualizado na Figura 7, o que permite uma fácil identificação destas.

Figura 7 – Morfologia das duas linhagens celular V79-4 e HepG2.

Para a preparação do meio de cultura, foi utilizado meio Dulbecco DMEM em pó (Cultilab Mat. Cultura Celular Ltda, Campinas-SP) suplementado com 3,5 g de glucose e 1,5 g de bicarbonato de sódio por litro de meio. O CO₂ dissolvido no meio reage com a água formando ácido carbônico, que a sua vez, libera íons HCO₃⁻ provocando uma diminuição do pH. Portanto, a inclusão de NaHCO₃ desloca o equilíbrio para manter o pH em 7,4. Por outro lado, a glucose é incluída como fonte de energia, metabolizada principalmente pela via glicolítica para formar piruvato, que é transformado a lactato o acetoacetato e pode entrar na rota do ácido tricarboxílico e ser oxidado para formar CO₂ e água.

A mistura é colocada em agitação e, após a diluição de todos os componentes, a solução é filtrada a vácuo através de filtro de 0,22 µm para eliminar os ricos de impurezas e assim ter um meio esterilizado. Após a filtragem, são adicionados 1 % (v/v) de uma solução contendo penicilina (100 U.I. mL⁻¹) e estreptomicina (0,1 mg mL⁻¹) (Cultilab) e 10 % (v/v) de soro fetal bovino. Obtém-se assim, o meio de cultura, que é mantido sob-refrigeração até sua utilização.

3.3 Passagem das duas linhagens celulares V79-4 e HepG2

As células aderentes, como é o caso da HepG2 e V79-4. A carga negativa no frasco de cultivo é necessária, pois a adesão celular ocorre por meio de forças eletrostáticas e da interação dessas cargas com glicoproteínas de adesão e com cátions divalentes, como Ca²⁺ e Mg²⁺. Esta interação, então, desencadeia uma sinalização no citoplasma que acarretará na produção e liberação de proteínas da matriz extracelular pela própria célula, onde a célula irá aderir e iniciar sua proliferação. As passagens das células foram realizadas a uma concentração de 10⁶ células mL⁻¹ (com contagem em câmara de Neubauer) para um frasco de cultura de 75 cm². As células são ressuspensas com tripsina e posterior centrifugação.

3.4 Preparação dos compostos

Os compostos utilizados nesse estudo foram diluídos em meio de cultura com dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração final de 0,5 % (v/v). A concentração da solução estoque dependerá das características de cada composto a ser testado e

foram feitas diluições seriadas de acordo com cada composto para posterior estudo de dose-resposta.

3.5 Preparação dos ensaios celulares

Para determinar os valores de viabilidade dos compostos selecionados nas células HepG2 e V79-4, primeiro realizou-se o processo de incubação da linha celular em um frasco T-25 ou T-75 (de acordo com o número de ensaios) para ressuspendê-la com tripsina e posterior centrifugação. Após ressuspensão, determinou-se o número de células por mL utilizando a câmara Neubauer e uma diluição foi realizada para aproximadamente 10^5 células mL^{-1} . Depois, 100 μL do meio de cultura foi adicionado aos poços que ficam no extremo da placa de 96 poços (colunas 1 e 12) e (filas A e H) para diminuir o efeito de borda, com adição de 100 μL do meio celular em cada poço (10^5 células mL^{-1}) incubação (37°C e 5 % CO_2) durante 24 h. Os compostos foram testados em quadruplicata e seus resultados foram posteriormente confirmados em um segundo experimento.

Após a incubação, o meio de cultura foi retirado por sucção e 100 μL do meio celular com composto e 0,5 % de DMSO foram adicionados em cada poço, seguido de incubação a 37°C e 5% CO_2 por 24 h. Após este período, o meio foi retirado e lavado com 50 μL de PBS. Em seguida, adicionou-se 20 μL de uma solução de PBS com 5 mg mL^{-1} de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e 80 μL de meio de cultura nos poços, onde permaneceu por 3 horas na incubadora de CO_2 sob abrigo da luz. Por último, o sobrenadante foi retirado e o agente solubilizante (10 g SDS, 100 mL DMSO e 0,6 mL de ácido acético glacial) foi adicionado, com incubação por 1 h e subsequente leitura de absorbância a 570 nm (Figura 8).

Figura 8 – Diagrama de preparação dos ensaios celulares para as linhagens V79-4 e HepG2

3.6 Quantificação dos resultados por meio de ensaio dose-resposta

Para determinar os valores de inibição celular (IC_{50}) de cada composto através das curvas de dose-resposta, foi planejada uma série de concentrações para cada composto a partir do valor estimado de inibição de crescimento da metade das células HepG2 e V79-4, obtido a partir da triagem realizada no início dos ensaios.

3.7 Preparação dos ensaios celulares de 24, 48 e 72 horas

A preparação dos ensaios de 24, 48 e 72 horas foi realizada baseada no item 3.5 descrito acima, tendo-se algumas modificações. A concentração utilizada para estes ensaios foi de $5 \cdot 10^4$ células mL^{-1} para as duas linhagens celulares. Houve a troca do meio celular após 24 horas de incubação do composto na célula, assim como, nas 48 e 72 horas. Após este período, o meio foi retirado e os poços foram lavados com 50 μL de PBS. Em seguida, adicionou-se 20 μL de uma solução de PBS com 5 mg mL^{-1} de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) juntamente com 80 μL de meio de cultura nos poços, onde

permaneceu por 3 horas na incubadora de CO₂ sob abrigo da luz. Por último, o sobrenadante foi retirado, com adição do agente solubilizante, incubação por 1 h, e leitura de absorbância a 570 nm.

3.8 Ensaio confirmatório por citometria de fluxo

As condições de crescimento celular foram descritas no item 3.5. No ensaio por citometria de fluxo, tripsina foi adicionada às células, com incubação por 10 minutos e posterior adição de uma solução de PBS com 20 % de FBS. Houve a incubação por 5 minutos após a adição do reagente Guava ViaCount[®] e quantificação no citômetro de fluxo Guava easyCyte 8HT (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) com a detecção de 1000 eventos para cada poço, de acordo com o fabricante. Os resultados foram analisados em software específico (Guava ViaCount Software).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento da série de moléculas para teste

Para o desenvolvimento desse trabalho foram testados mais de trinta compostos, dentre eles compostos antitumorais e compostos com atividade antiparasitária. Para a determinação citotóxica desses compostos foram utilizadas duas linhagens celulares: HepG2 e V79-4. Os doze primeiros compostos selecionados foram obtidos a partir de um registro feito pelo *National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health* (NIH Publication No: 01-4500).⁵⁹ Este é um dos principais programas de validação e normatização de ensaios *in vitro* nos Estados Unidos. No trabalho descrito pelo NIH, é apresentada uma correlação diretamente proporcional entre os resultados obtidos para a linhagem Balb-c 3T3 e os dados de atividade tóxica para administração oral em camundongos e ratos (LD₅₀) usando 347 compostos químicos. Assim, a série de moléculas foi delineada tendo como referência os valores de inibição celular para a linhagem celular Balb-c 3T3 (fibroblasto de camundongo), onde as moléculas apresentaram valores de inibição celular (IC₅₀) bem distintos, para que cobrissem a maior faixa de citotoxicidade possível. A partir desta informação, doze compostos (Tabela 1) formaram a base de dados do espectro de citotoxicidade para realizarmos os ensaios *in vitro* de citotoxicidade para as linhagens V79-4 (fibroblasto de hamster) e HepG2 (câncer de fígado). Assim pode-se ter uma estimativa dos valores de IC₅₀ para os compostos selecionados.

Durante os ensaios citotóxicos dos compostos, foram padronizadas as condições para realização dos ensaios *in vitro*. Primeiramente, foram determinadas as curvas de crescimento para HepG2 e V79-4. Esta informação é importante já que nos indica o estado da cultura, que é um parâmetro crítico para a realização de um teste, uma vez que as culturas de células variam significativamente na observação temporal entre a fase estacionária inicial, a fase exponencial e a fase estacionária final. Portanto, é importante conhecer o estado da cultura antes e depois de um ensaio, a fim de determinar se as células estão crescendo constantemente ao tempo de duplicação da população (PDT) e seu tempo do ciclo celular. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 9.

Tabela 1- Lista dos compostos selecionados para os ensaios celulares *in vitro*

Compostos	Fórmula Molecular
Dodecilsulfato de sódio	$C_{12}H_{25}NaO_4S$
Dicromato de potássio	$K_2Cr_2O_7$
Triton x-100	$C_{12}H_{26}O(OCH_2CH_2)_{10}$
Glicose	$C_6H_{12}O_6$
Etanol	CH_3CH_2OH
Acrilamida	C_3H_5NO
Dimetilsulfóxido	C_2H_6OS
Imidazol	$C_3H_4N_2$
Dioxano	$C_4H_8O_2$
p-nitrofenol	$C_6H_5NO_3$
Doxorrubicina	$C_{27}H_{29}NO_{11}$
Azul de tripan	$C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$

Figura 9 – Curva de crescimento das células HepG2 e V79-4

A concentração inicial utilizada para determinar a curva de crescimento das duas linhagens celulares foi de 1×10^4 células mL⁻¹ em frasco T25.⁶⁰ Na curva de crescimento da HepG2 é possível observar que a partir do sexto dia de incubação, a célula começa a multiplicar-se mais rapidamente, alcançando uma concentração de $2,34 \cdot 10^6$ células mL⁻¹ no sétimo dia, que seria a fase exponencial onde as células têm maior proliferação. Também se pode observar que nos primeiros quatro dias de incubação as células HepG2 ficaram na fase de estacionária inicial, onde as células são mais consistentes e uniformes devido a sua adaptação. Porém, não é muito notório o aumento da concentração nesses dias iniciais. Após a fase de crescimento exponencial, observa-se que as células começaram a crescer mais lentamente

entrando na fase estacionária final no oitavo dia. Portanto, é necessário coletar as células na fase exponencial. Para a célula V79-4, a fase estacionária inicial foi mais rápida do que a célula HepG2. A partir terceiro dia a célula começou a multiplicar-se mais rapidamente alcançando a fase estacionária no quinto dia, apresentando uma concentração de $1,34 \cdot 10^7$ células mL^{-1} . Após esse período, a concentração celular da V79-4 caiu a $1,17 \cdot 10^7$ células mL^{-1} devido ao excesso de células no frasco de cultura.

Posteriormente, foi determinada a concentração de células necessárias para desenvolver os ensaios de citotoxicidade em placas de 96 poços. Inicialmente testou-se quatro tipos de concentração celular para ambas as células, $1 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$ e $5 \cdot 10^5$ células mL^{-1} . Destas quatro concentrações, a mais indicada foi $1 \cdot 10^5$ células mL^{-1} de acordo com os resultados de MTT e observação no microscópio. É importante ressaltar que os ensaios celulares teriam um período de duração de 48 horas somando às 24 horas de incubação das células sem composto, o qual foi descrito no item 3.5 da parte experimental. Portanto, o poço não poderia estar com baixa ou elevada confluência de células no primeiro dia, o que inibe a sua replicação. Outro fator importante é a concentração de dimetilsulfóxido (DMSO) na célula, uma vez que os compostos testados eram pouco solúveis em água. Finalmente, outro fator a ser considerado é a concentração de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) na célula, que poderia ser 5 ou 10 mg mL^{-1} . Conforme observado neste ensaio e reportado em vários artigos, a concentração de MTT usada foi 5 mg mL^{-1} ,^{61, 62, 63} pois não havia diferença significativa na absorbância nas duas concentrações testadas.

Na literatura é relatado que o dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto que bloqueia o aumento de cálcio intracelular induzido por diferentes agentes,^{64,65} ou o aumento de sódio, potássio e cálcio extracelular.⁶⁶ Por outro lado, é descrito que o DMSO a uma concentração de 2,5 % em células de linfoma de rato induz apoptose inibindo a proteína Bcl-2, liberando citocromo c da mitocôndria, ativando a caspase-9 iniciadora e executando a caspase-3.⁶⁶ Portanto, é importante saber a concentração de DMSO usada nas células para que este não interfira nos resultados obtidos. A concentração ideal para os ensaios celulares foi de 0,5 % para as duas linhagem celulares (V79-4 e HepG2) que apresentou uma porcentagem de viabilidade superior a 95 % (Figura 10). Esta porcentagem de DMSO não afetou o crescimento da célula nem interferiu na sua morfologia celular.

Figura 10 – Porcentagem de viabilidade celular nas linhagens HepG2 e V79-4 para o DMSO

4.2 Análise da triagem dos compostos para a célula V79-4

A triagem inicial dos compostos foi realizada usando três concentrações diferentes: 500, 100 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para determinar sua percentagem de citotoxicidade. Estas três concentrações foram selecionadas de acordo como os valores obtidos de IC_{50} para a célula Balb-c obtido nos ensaios do NIH.

Com a finalidade de facilitar a análise dos dados, quatro moléculas foram usadas em cada gráfico. Na Figura 11, podem-se observar os valores de viabilidade celular de cada composto referente às três concentrações selecionadas anteriormente. O dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) apresentou uma citotoxicidade superior aos outros compostos com uma percentagem de viabilidade celular inferior a 30 % na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto, que o azul de tripan, o *p*-nitrofenol e o SDS, apresentaram uma percentagem de viabilidade celular superior a 50 % na mesma concentração.

Nas concentrações de 500 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ inibiu totalmente a célula V79-4 e seu resultado somente é comparável com o dodecilssulfato de sódio (SDS) um detergente que desestabiliza a membrana da célula, inibindo 100 % na concentração de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O composto azul de tripan apresentou discrepâncias nos valores de viabilidade celular, devido à interferência dos cristais de formazan formados, quando o MTT é metabolizado pela célula, no comprimento de onda de 570 nm, onde apresenta a sua máxima absorção. Portanto, os resultados das

triagens para esse composto não foram satisfatórios para os ensaios e foram posteriormente desconsiderados.

Figura 11 – Viabilidade celular dos compostos $K_2Cr_2O_7$, azul de tripan, *p*-nitrofenol e SDS para a célula V79-4

A acrilamida, o imidazol, a glicose e o triton X-100 compuseram o segundo subconjunto (Figura 12). Desses quatro compostos, o triton X-100 apresentou uma maior citotoxicidade conforme esperado, uma vez que este detergente atua na permeabilidade e lise celular. É importante ressaltar que a glicose sendo uma molécula importante para o metabolismo da célula, seja mais tóxica que os compostos acrilamida e imidazol nas mesmas concentrações, porque a alta concentração de glicose na célula diminui os níveis de ATP intracelular para a geração de energia devido à supersaturação, o qual leva a morte celular por apoptose.

As atividades citotóxicas do dimetilsulfóxido (DMSO), dioxano e etanol estão mostradas na Figura 13. Os resultados para o dioxano apresentam inconsistências por causa da elevada volatilidade do composto na placa de 96 poços no período de incubação a 37 °C, provocando a liberação do composto e apresentando erros nos cálculos de viabilidade celular. Devido à incerteza dos valores achados para o dioxano, tomou-se a decisão de retirar o composto dos ensaios celulares.

Figura 12 – Viabilidade celular dos compostos Acrilamida, Imidazol, Glicose e Triton X-100 para a célula V79-4

Figura 13 – Viabilidade celular dos compostos 1,4-Dioxano, DMSO e Etanol na linhagem celular V79-4

4.3 Análise da Triagem dos compostos para a linhagem celular HepG2

Tendo como referência os valores de viabilidade para a primeira linhagem celular V79-4, prosseguiu-se a determinar a citotoxicidade celular dos compostos para a linhagem celular HepG2. As moléculas apresentadas na Figura 14

apresentaram um comportamento similar ao da triagem com a célula V79-4 (Figura 11). Comparando os gráficos para esses mesmos compostos, pode-se observar que as células HepG2 foram mais resistentes do que a V79-4. A tabela abaixo apresenta as comparações de viabilidade celular das duas linhagens celulares frente aos compostos (Tabela 2).

Figura 14 - Viabilidade celular dos compostos K₂Cr₂O₇, azul de tripan, p-nitrofenol e SDS para a célula HepG2

Tabela 2 – Comparação da viabilidade celular dos compostos dicromato de potássio, p-nitrofenol e SDS

Compostos	% Viabilidade Celular (100 µM)		% Viabilidade Celular (10 µM)	
	V79-4	HepG2	V79-4	HepG2
Dicromato de K	0,3	9	29	42
p-nitrofenol	48	59	54	70
SDS	44	68	67	77

Os compostos de acrilamida, imidazol e glicose foram menos citotóxicos para HepG2 (Figura 15) quando comparado com V79-4 (Figura 12). A glicose é mais tóxica que o mesmo imidazol ou acrilamida tanto na V79-4 quanto na HepG2. Embora, a célula tumoral capte mais glicose para a geração de energia (ATP), a alta concentração de glicose na célula produz um grande consumo de oxigênio pela célula, que leva a morte por hipóxia.⁶⁷

Por último, foram testados os compostos dioxano, DMSO e etanol na célula HepG2 terminando os primeiros testes citotóxicos para as moléculas (Figura 16) com o mesmo padrão observado anteriormente.

Figura 15 – Viabilidade celular dos compostos Acrilamida, Imidazol, Glicose e Triton X-100 para a célula HepG2

Figura 16 – Viabilidade celular dos compostos 1,4-Dioxano, DMSO e Etanol na linhagem celular HepG2

O último composto avaliado desta triagem foi a doxorrubicina, uma antraciclina que é um potente agente citotóxico para as células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*.⁶⁸ É um agente quimioterapêutico com uma forte atividade contra uma ampla variedade de tumores malignos dentre eles leucemia aguda, câncer de mama,

doença de Hodgkin e sarcomas.⁶⁹ O mecanismo de ação deste composto é evidenciado quando a doxorrubicina interage com o DNA por intercalação e inibição da biossíntese de macromoléculas. Isto inibe a progressão da enzima topoisomerase II, o qual relaxa a dupla hélice no DNA na transcrição. A doxorrubicina estabiliza a topoisomerase II, após quebrar a cadeia de DNA na replicação, impedindo que a dupla hélice forme-se de novo, desse modo, interrompendo o processo de replicação.⁷⁰ Portanto, é uma molécula de referência para nossos ensaios já que ela apresenta uma maior citotoxicidade que os compostos selecionados. Neste caso em particular, foram testadas cinco concentrações diferentes para as duas linhagens celulares em estudo: 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com o objetivo de estimar a concentração necessária para inibir 50 % das células tanto na HepG2 quanto na V79-4. Os resultados destes testes são apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Comparação da viabilidade celular nas duas linhagens para a doxorrubicina

O gráfico comparativo das duas linhagens celulares frente às diferentes concentrações de doxorrubicina descritas mostra que a célula tumoral é um pouco mais resistente que a célula de fibroblasto. Como a melhor forma para comparar a atividade biológica de uma molécula é obtida a partir da análise quantitativa foi necessário realizar a curva de dose-reposta para estes compostos, em especial para a doxorrubicina.

4.4 Curvas de dose-resposta dos compostos nas linhagens celulares V79-4 e HepG2

De acordo com os valores obtidos das triagens realizadas nas duas linhagens celulares, foi possível conhecer a citotoxicidade das moléculas selecionadas, assim como estimar a concentração de cada composto necessária para inibir 50 % das células tumorais (Figura 18, Tabela 3) e de fibroblasto (Figura 19, Tabela 4).

Figura 18 – Curva dose-reposta para os compostos Acrilamida, imidazol, p-nitrofenol, $K_2Cr_2O_7$ e Doxorrubicina, na linhagem celular HepG2

Tabela 3 – Valores de IC₅₀ dos compostos selecionados na linhagem celular HepG2

Composto	IC ₅₀	Composto	IC ₅₀
Dioxano	472,2 mmol L ⁻¹	Dicromato de K	35,4 μmol L ⁻¹
DMSO	278,2 mmol L ⁻¹	Acrilamida	5,65 mmol L ⁻¹
Glicose	372,9 mmol L ⁻¹	Imidazol	42,3 mmol L ⁻¹
Triton X-100	46,4 μmol L ⁻¹	p-Nitrofenol	1,0 mmol L ⁻¹
SDS	0,24 mmol L ⁻¹	Doxorrubicina	1,22 μmol L ⁻¹

Figura 19 – Curva dose-reposta para os compostos Acrilamida, imidazol, p-nitrofenol, K₂Cr₂O₇ e Doxorrubicina, na linhagem celular V79-4

Tabela 4 – Valores de IC₅₀ dos compostos selecionados para a linhagem celular V79-4

Composto	IC ₅₀	Composto	IC ₅₀
Dioxano	54,3 mmol L ⁻¹	Dicromato de K	2,53 µmol L ⁻¹
DMSO	303,7 mmol L ⁻¹	Acrilamida	4,0 mmol L ⁻¹
Glicose	227,4 mmol L ⁻¹	Imidazol	65,9 mmol L ⁻¹
Triton X-100	61,6 µmol L ⁻¹	p-Nitrofenol	1,4 mmol L ⁻¹
SDS	0,15 mmol L ⁻¹	Doxorrubicina	6,9 µmol L ⁻¹

4.5 Análises das triagens de viabilidade celular dos compostos com atividade antiparasitária

Após a obtenção dos valores obtidos das triagens e dos valores de inibição celular (IC₅₀) das curvas de dose-resposta para os compostos, foi realizada uma seleção de dezessete compostos que apresentaram atividade antiparasitária contra o *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico da doença de Chagas) testados no grupo NEQUIMED. O objetivo desses testes era avaliar a citotoxicidade dos compostos selecionados para as células de fibroblasto (V79-4) que é uma informação importante para priorizar as melhores moléculas para estudos posteriores. Além disso, foi avaliada a atividade antitumoral na célula de fígado (HepG2).

Várias moléculas desta série apresentam como grupo funcional a 1,2,5-oxadiazol-3-amina (Figura 20), com atividade anticancerígena relacionada à inibição de quinases, como a fosfatidilinositida 3-quinase.⁷¹ Estas moléculas foram inicialmente estudadas quanto a sua atividade tripanosomicida, mas foram selecionadas para os estudos *in vitro* devido ao padrão estrutural comum em inibidores de quinases, observado em estudos *in silico* baseado na mTOR em nosso grupo de pesquisa.

Figura 20 – Padrão estrutural de compostos inibidores de quinases identificado nas moléculas NEQUIMED

As concentrações usadas para estas triagens foram 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Concentrações superiores a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ não tinham interesse para os estudos e não foram utilizadas.^{72,73}

Figura 21 – Moléculas NEQUIMED selecionadas para os testes *in vitro*

Molécula	Molécula	Molécula
Neq265	Neq256	Neq259

Neq09	Neq257	Neq260

Neq255	Neq258	Neq261

Neq262	Neq385	Neq389

Neq263	Neq387	Neq391

Neq264	Neq388

4.5.1 Análises das triagens de viabilidade celular dos compostos com atividade antiparasitária para a linhagem celular V79-4

Inicialmente foram avaliados os compostos Neq265, 09, 255, 256, 257 e 258 na linhagem celular V79-4 que permitiu verificar a citotoxicidade destas moléculas (Tabela 5, Figura 22). A linhagem celular V79-4 é muito utilizada para avaliar diferentes mecanismos de morte celular (hipóxia,⁷⁴ apoptose⁷⁵ e necrose⁷⁶) ou para determinar a citotoxicidade de compostos com atividade antiparasitária,⁷⁷ antitumoral⁷⁸ e antifúngica.⁷⁹

Dentre as moléculas analisadas, o composto Neq256 mostrou uma porcentagem de viabilidade celular baixa de 12 % na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de 80 % na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mostrando-se bastante citotóxica quando comparada com as outras moléculas testadas. Outro aspecto importante a ressaltar, é a sua estrutura molecular, já que ela apresenta um grupo nitro ligado ao anel aromático da molécula, que explica a elevada citotoxicidade. No entanto, nitrocompostos candidatos a agentes terapêuticos atuam como antibacterianos, antiparasitários e até como antineoplásicos, o que ressalta a importância desta classe de compostos.^{80,81}

Tabela 5 – Porcentagem de viabilidade de células V79-4 para os compostos Neq265, 09, 255, 256, 257 e 258

Molécula	% Viabilidade celular		Molécula	% Viabilidade celular	
Nequimed 265	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Nequimed 256	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
98	92		80	12
Nequimed 09	91	59	Nequimed 257	92	89

Nequimed 255	88	77	Nequimed 258	93	68

A atividade biológica desta classe de moléculas é dependente da presença do grupo nitro ligado ao composto e resulta, basicamente, de mudanças na estabilidade do mesmo, intermediada por interações entre o nitrocomposto e seu alvo. Estas mudanças ocorrem devido à facilidade de redução do grupo nitro, característica resultante de seu caráter aceitador de elétrons, bem como pelo efeito de ressonância em sua estrutura.⁸² Por outro lado, o mecanismo de ação a nível molecular ainda não está bem estabelecido, uma vez que pode variar de acordo com diferenças estruturais dos compostos.

A passagem transmembrana destas moléculas ocorre por difusão passiva e aumenta à medida que os radicais livres, provenientes do processo de biorredução, desestabilizam a membrana celular. Assim, devido ao aumento da concentração intracelular do nitrocomposto (Neq256), maior quantidade de radicais livres é gerada e, conseqüentemente, maior é o dano causado pelo estresse oxidativo.⁸³ Além disso, Neq256 também apresenta uma instauração que pode atuar como aceitador

de Michael, levando ao ataque e formação de ligação covalente com nucleófilos presentes em várias macromoléculas.

Figura 22 – Triagem de viabilidade das células V79-4 para os compostos Neq265, 09, 255, 256, 257 e 258

Os compostos Neq265, 255, 257 e 258, mostraram uma porcentagem de viabilidade celular superior a 65 % na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de 85 % na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estes valores de viabilidade dos compostos NEQUIMED mostraram uma baixa citotoxicidade frente à linhagem celular V79-4 (exceto as moléculas Neq256 e 09). Este é um resultado satisfatório, pois os compostos que apresentam atividade biológica devem exibir uma maior seletividade frente ao alvo tumoral ou parasitário, em relação às células saudáveis do organismo.

Após os resultados para as seis primeiras moléculas NEQUIMED, foi testada uma segunda série de moléculas: Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264 (Tabela 6). As moléculas desta segunda série não apresentaram citotoxicidade importante para a célula sadia nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Uma comparação dos valores de viabilidade celular é mostrada na Figura 25.

Tabela 6 – Porcentagem de viabilidade das células V79-4 para os compostos Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264

Molécula	% Viabilidade celular		Molécula	% Viabilidade celular	
Nequimed 259	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Nequimed 262	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
94	67		86	71
Nequimed 260	88	71	Nequimed 263	82	62

Nequimed 261	82	74	Nequimed 264	83	63

Figura 23 - Triagem de viabilidade das células V79-4 para os compostos Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264

Deve-se ressaltar que estas moléculas foram selecionadas para inibir processos importantes do metabolismo do parasito (*Trypanosoma cruzi*). Um desses é a glicólise, considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos, porque este processo bioquímico exerce um papel essencial no fornecimento de energia, na forma de ATP, para o parasito.

Dando seguimento aos testes citotóxicos, foi testada a última série (Neq385, 387, 388, 389 e 391) onde os resultados são apresentados na Tabela 7 e Figura 24.

Tabela 7 – Porcentagem de viabilidade de células V79-4 para os compostos Neq385, 387, 388, 389 e 391

Molécula	% Viabilidade celular		Molécula	% Viabilidade celular	
Nequimed 385	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Nequimed 389	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
85	82		91	90
Nequimed 387	91	85	Nequimed 391	91	66

Nequimed 388	81	41

O composto Neq388 apresentou uma porcentagem de viabilidade celular baixa de 41 % na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ comparável com o composto Neq256 da primeira série, que teve uma viabilidade celular de 12 % na mesma concentração. Estas moléculas foram as únicas que apresentaram um alto valor de inibição celular para a célula de fibroblasto, mas é importante aclarar que esta

concentração testada na célula ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) é alta para os ensaios celulares *in vitro*.

Figura 24 - Triagem de viabilidade das células V79-4 para os compostos Neq385, 387, 388, 389 e 391

Das dezessete moléculas testadas somente duas apresentaram um valor de citotoxicidade relevante no fibroblasto (Neq256 e 388). Além disso, quatro moléculas exibiram a baixa toxidez (Neq 09, 263, 264 e 391) frente a mesma linhagem celular.

Embora as moléculas Neq256 e 388 apresentassem valores de citotoxicidade para a linhagem celular V79-4 na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, não foi determinado os valores de IC_{50} para cada um deles, devido à baixa solubilidade dos compostos exibida em dimetilsulfóxido (DMSO). Além disso, concentrações acima de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ levavam a precipitação na placa de 96 poços, o que dificultou a determinação dos valores de IC_{50} .

4.5.2 Análise das triagens de viabilidade celular dos compostos com atividade antiparasitária para a linhagem celular HepG2

De igual forma, prosseguiu-se a determinar a atividade das moléculas na célula tumoral de fígado (HepG2), já que isso, aumentaria o espaço químico para encontrar novos compostos que possam levar a uma molécula matriz (Tabela 8).

Tabela 8 – Porcentagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq265, 09, 255, 256, 257 e 258

Molécula	% Viabilidade celular		Molécula	% Viabilidade celular	
Nequimed 265	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Nequimed 256	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
92	84		89	33
Nequimed 09	91	74	Nequimed 257	86	78

Nequimed 255	92	79	Nequimed 258	90	77

A molécula Nequimed 256 apresentou uma atividade considerável frente a célula tumoral mostrando uma viabilidade celular de 33 % na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Se comparamos com a inibição frente à V79-4 descrita na Tabela 5, podemos inferir que esta molécula não é seletiva para a célula tumoral. Esta molécula poderá ter sua estrutura química modificada com a finalidade de se identificar novas moléculas que sejam seletivas para as células cancerígenas. As outras moléculas testadas são apresentadas em um gráfico comparativo de viabilidade celular frente a cada concentração avaliada (Figura 25).

Figura 25 – Triagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq265, 09, 255, 256, 257 e 258

As moléculas Neq265, 09, 255, 257 e 258 apresentaram baixa potência para as células HepG2, sem seletividade frente a célula de fibroblasto (V79-4).

Posteriormente, foi avaliada a segunda série de moléculas Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264 para a mesma linhagem celular (Tabela 9, Figura 26). As moléculas Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264, não apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem celular HepG2.

Tabela 9 – Porcentagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264

Molécula	% Viabilidade celular		Molécula	% Viabilidade celular	
Nequimed 259	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Nequimed 262	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
91	81		92	83
Nequimed 260	86	79	Nequimed 263	82	63

Nequimed 261	86	74	Nequimed 264	90	82

Figura 26 - Triagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq259, 260, 261, 262, 263 e 264

Dando conclusão aos testes de citotoxicidade, foi avaliada a última série de moléculas. Pode-se observar que esta última série de moléculas não apresenta uma correlação estrutural que possa ser comparada com outras moléculas avaliadas ou com as moléculas da mesma série. Estes resultados são exibidos na Tabela 10.

Tabela 10 – Porcentagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq385, 387, 388, 389 e 391

Molécula	% Viabilidade celular		Molécula	% Viabilidade celular	
Nequimed 385	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Nequimed 389	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
68	41		85	77
Nequimed 387	83	78	Nequimed 391	85	66

Nequimed 388	75	42

Dentre de este último conjunto de moléculas avaliadas, pode-se observar que os compostos Neq385 e 388 apresentaram uma boa atividade citotóxica frente à célula HepG2 com uma porcentagem de viabilidade de 41 e 42 % na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente (Figura 27). A molécula Neq385 foi a única da série que apresentou uma boa seletividade para a linhagem tumoral, pois a viabilidade celular foi maior para as células de fibroblasto (82 % na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Figura 27 - Triagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos Neq385, 387, 388, 389 e 391

Por outro lado, a molécula Neq388 não exibiu nenhuma seletividade, tendo valores de viabilidade celular de 40 % para as duas linhagens celulares. Embora a molécula Neq388 não tenha apresentado seletividade, ela também pode ser considerada uma molécula promissora, para que modificações em sua estrutura química sejam realizadas para aumentar a potência.

Após culminação dos testes celulares *in vitro* das dezessete moléculas avaliadas para a célula tumoral HepG2 foi planejada uma curva de dose-resposta, afim de determinar os valores de inibição celular (IC_{50}) para as melhores moléculas que apresentaram atividade biológica. No entanto, devido a pouca solubilidade exibida em DMSO e à precipitação dos compostos apresentada na célula, não foi possível determinar os valores de IC_{50} .

4.5.3 Análise da triagem dos compostos antitumorais nas células V79-4 e HepG2

As últimas triagens realizadas nas duas linhagens celulares estudadas neste projeto foram os compostos antitumorais rapamicina, etoposídeo, bicalutamida, MDV-3100 (enzalutamida), YM 155 e uma molécula antiparasitária e antifúngica - o posaconazol (Figura 28). Para esta triagem foram selecionadas três concentrações diferentes: 1, 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 28 – Estrutura química das moléculas antitumorais e antiparasitária

<p>Posaconazol</p>	<p>Etoposídeo</p>
<p>MDV 3100</p>	<p>Rapamicina</p>
<p>Doxorrubicina</p>	<p>YM 155</p>
<p>Bicalutamida</p>

Estes compostos foram escolhidos devido aos estudos de câncer de próstata e de fígado que vem sendo desenvolvidos no Laboratório de Ensaio Celulares do Grupo de Química Medicinal (LabECel-NEQUIMED) estabelecendo uma possível seletividade destas moléculas frente às diferentes linhagem celulares estudadas.

A rapamicina é um composto conhecido pela sua propriedade imunodepressiva e antitumoral na inibição da serina treonina quinase de mamíferos (mTOR)^{84,85} induzindo a detenção do ciclo celular na fase de transição G1/S.⁸⁶

O etoposídeo é um antineoplásico bem caracterizado, derivado semissintético da podofilotoxina que tem sido usado para o tratamento de uma variedade de

doenças malignas como linfomas, câncer de testículo e câncer de pulmão. O etoposídeo inibe a síntese de DNA formando um complexo com a topoisomerase II (uma enzima essencial que controla a topologia do DNA pela passagem de uma dupla hélice intacta através de uma transitória quebra da dupla fita de DNA em uma reação dependente de ATP)⁸⁷ e o DNA. Esse complexo induz quebras no DNA e impede o reparo pela ligação da topoisomerase II. Quebras acumuladas no DNA impedem a entrada na fase mitótica do ciclo celular, e leva à morte celular. O etoposídeo induz a detenção da fase G2 e S do ciclo celular e inibindo a proliferação celular.^{88,89}

A bicalutamida é um antiandrógeno não esteroide que é desprovido de outros efeitos endócrinos. É um inibidor do receptor andrógeno (AR) envolvido no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Portanto, antagoniza competitivamente as ações dos andrógenos e outros ligantes ao nível do receptor, acelerando a degradação do receptor andrógeno e inibindo assim o crescimento de tumores de próstata.^{90,91}

A enzalutamida (MDV-3100) é um composto antiandrógeno de segunda geração que está na fase III clínica e, ao contrário da bicalutamida, a enzalutamida não promove a translocação do receptor andrógeno para o núcleo. Além disso, impede a ligação do AR ao DNA e suas proteínas coativadoras. Estes compostos de segunda geração foram desenvolvidos, uma vez, que foi encontrado uma resistência das células tumorais de próstata frente estes compostos de primeira geração devido aos altos níveis de AR expressos na célula.⁹²

A YM-155 é uma pequena molécula imidazólica e supressora da survivina (membro da família de proteínas inibidoras de apoptose - IAP) que está implicada na supressão da apoptose, assim como, na regulação da mitose,⁹³ e foi selecionada mediante ensaios HTS (*high throughput screening*).⁹⁴ A YM-155 causa a morte celular *in vitro*, induz o retrocesso de tumores de linfoma, câncer de próstata e de pulmão *in vivo*,⁹⁵ assim como, em diversos tipos de tumores.

Assim torna-se relevante testar esta série de compostos bioativos como uma referência para as novas moléculas em estudo. As primeiras triagens iniciais de viabilidade celular para estas moléculas foram realizadas para a linhagem celular V79-4 (Tabela 11 & Figura 29).

Tabela 11 – Porcentagem de viabilidade da célula V79-4 para os compostos antitumorais e antiparasitário

Moléculas	%Viabilidade celular			Moléculas	%Viabilidade celular		
Bicalutamida	100 μmol^{-1}	10 μmol^{-1}	1 μmol^{-1}	Rapamicina	100 μmol^{-1}	10 μmol^{-1}	1 μmol^{-1}
59	74	89		78	82	91
Etoposídeo	69	87	96	YM 155	49	69	92

MDV 3100	60	79	93	Posaconazol	54	74	92

Figura 29 – Comparação dos valores de viabilidade da célula V79-4 para os compostos antitumorais e antiparasitário

Os resultados demonstraram baixa citotoxicidade dos compostos, levando-se em consideração que são quimioterápicos.

Após obtenção dos resultados de viabilidade celular dos compostos antitumorais e antiparasitário, foi realizado o mesmo procedimento para a célula tumoral de fígado. Os valores de viabilidade celular para a linhagem celular HepG2 são apresentados na Tabela 12 e Figura 30.

Tabela 12 – Porcentagem de viabilidade da célula HepG2 para os compostos antitumorais e antiparasitário

Moléculas	%Viabilidade celular			Moléculas	%Viabilidade celular		
Bicalutanida	100 μmol^{-1}	10 μmol^{-1}	1 μmol^{-1}	Rapamicina	100 μmol^{-1}	10 μmol^{-1}	1 μmol^{-1}
46	68	79		58	67	72
Etoposídeo	48	62	77	YM 155	2	9	37

MDV 3100	65	70	83	Posaconazol	66	77	82

Das seis moléculas avaliadas sobre a célula de câncer de fígado (HepG2), a YM-155 apresentou os melhores resultados de atividade biológica nas três concentrações testadas. Além disso, exibiu uma seletividade frente às células cancerígenas decorrente da inibição da survivina, que está expressa em maior concentração nas células tumorais e relativamente baixa em tecidos adultos normais diferenciados.⁹⁶

Weiyang et al. Determinaram que a molécula YM-155 induz o mecanismo de apoptose ativando concomitantemente as caspases 8 e 3 respectivamente em células HL-60 e U937.⁹⁷ Além disso, eles determinaram os valores de IC₅₀ para as duas linhagens células avaliadas na ordem de 0,3 nmol L⁻¹ e 0,8 nmol L⁻¹ respectivamente. Portanto, a survivina torna-se um alvo terapêutico importante para a descoberta de novos agentes quimioterápicos para o tratamento de vários tipos de câncer, dentre eles o câncer de fígado e de próstata.

Figura 30 – Comparação dos valores de viabilidade da célula HepG2 para os compostos antitumorais e antiparasitário

Conforme esperado, a bicalutamida e MDV3100 tiveram baixa potência, uma vez que atuam no receptor andrógeno, que não apresenta relevância para a célula HepG2.

A rapamicina e posaconazol não apresentaram atividade biológica frente à célula HepG2. O posaconazol, como dito anteriormente é uma molécula antiparasitária ativa contra o parasito *Trypanosoma cruzi*, enquanto que a rapamicina foi inativa, embora atue em uma quinase importante para a célula.

4.5.4 Curvas dose-resposta para a YM-155

De acordo com as triagens realizadas, a molécula YM-155 apresentou grande seletividade para a célula neoplásica (HepG2). Portanto, determinou-se o valor de IC_{50} mediante uma curva de dose-resposta para as duas linhagens celulares estudadas utilizando o programa GraphPad Prism (versão 5, GraphPad Software, Inc.). As concentrações selecionadas para fazer a curva de dose-resposta foram diferentes para cada tipo de célula, já que foi levando em consideração os valores obtidos das triagens realizadas. Portanto, foram selecionadas doze concentrações para a célula V79-4 na faixa de $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ até 1 mmol L^{-1} e para a célula HepG2, foram selecionadas 10 concentrações na faixa de $0,001 \mu\text{mol L}^{-1}$ até $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 31).

Figura 31 – Curva de dose-resposta para a molécula YM-155 nas linhagens celulares V79-4 e HepG2

O valor de IC_{50} determinado para a célula HepG2 foi da ordem de cem nanomolar. A curva de dose-resposta gerada para a linhagem celular HepG2 mostrou uma boa linearidade dos pontos frente ao ajuste senoidal que determina o IC_{50} apresentado $R^2 = 0,98$. Por outro lado, o valor de IC_{50} para a linhagem celular V79-4 não foi determinado por causa da falta de ajuste de um modelo aos pontos.

Quando se compararam os valores de IC_{50} da doxorrubicina que foi o controle positivo para todos os ensaios realizados para os compostos-teste e a YM-155 frente

ao fibroblasto (V79-4), pode-se ressaltar que a doxorubicina exibiu uma maior citotoxicidade na célula de fibroblasto (com $IC_{50} = 6,90 \pm 0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$ e inibição total a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Enquanto que a YM-155 na mesma concentração inibiu somente 50 % das células V79-4 na concentração mais alta administrada (Figura 32).

Figura 32 – Comparação das curvas de dose-resposta das molécula YM-155 e doxorubicina na linhagem celular V79-4

Os resultados da avaliação do composto-teste YM-155 frente à célula neoplásica (HepG2), mostrou ser mais potente que a doxorubicina (controle positivo) contra a célula de fígado. O valor determinado de IC_{50} para a doxorubicina foi de $1,22 \pm 0,033 \mu\text{mol L}^{-1}$ na célula tumoral de fígado, levando em conta, que na máxima concentração ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) a doxorubicina não inibiu 100 % das células. No entanto, a YM-155 apresentou potência de $0,094 \pm 0,041 \mu\text{mol L}^{-1}$, além de inibir 100 % das células na máxima concentração avaliada ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Este resultado mostra uma grande seletividade e potência da molécula YM-155 frente à célula neoplásica (HepG2). Charette *et al.* avaliaram a citotoxicidade da YM-155 na célula HepG2 determinando o valor de IC_{50} em $0,064 \mu\text{mol L}^{-1}$.⁹⁸ Este valor é próximo do conseguido nosso laboratório. O gráfico comparativo de IC_{50} para a doxorubicina e YM-155 na célula neoplásica HepG2, é apresentado na Figura 33.

Figura 33 – Comparação das curvas de dose-resposta das molécula YM-155 e doxorubicina na linhagem celular HepG2

4.6 Avaliação da citotoxicidade da YM-155 na célula neoplásica em período de incubação de 24, 48 e 72 horas

O último teste colorimétrico realizado para a molécula YM-155 na linhagem celular HepG2 foi determinar a citotoxicidade do composto após 24, 48 e 72 horas, com o objetivo de determinar se a atividade biológica da molécula seria diminuída após incubação por 24 horas. Para estes ensaios foram selecionadas cinco concentrações 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Na tabela 13, os valores de viabilidade celular do composto YM-155 na célula tumoral após 24, 48 e 72 horas de incubação são mostrados.

Tabela 13 – Valores de viabilidade celular do composto YM-155 na célula HepG2 após 24, 48 e 72 horas

Concentração $\mu\text{mol L}^{-1}$	% Viabilidade celular		
	24 horas	48 horas	72 horas
100	0,8	0,5	0,4
10	2,0	0,8	0,5
1	35,9	9,2	8,5
0,1	55,2	29,1	28,3
0,01	89,3	78,5	88,5

Pode-se observar que após 24 horas de incubação do composto YM-155, os valores de viabilidade celular para a célula tumoral HepG2 tendem a diminuir de uma forma proporcional em todas as concentrações selecionadas, mesmo após 72 horas (Figura 34). Este resultado corrobora com o mecanismo proposto para esta molécula, que atua reduzindo a expressão da survivina, levando à morte celular. Para as células cancerígenas se multiplicarem, faz-se necessário expressar survivina, o que demandará tempo. Além disso, o composto leva a morte celular, ao invés de atuar como citostático, pois para tal deveria levar a uma replicação rápida das células após curto período sem o composto.

Figura 34 - Viabilidade celular do composto YM-155 frente ao tempo de incubação para cada concentração selecionada na célula HepG2

Posteriormente, estes valores obtidos para a YM-155 foram comparados com a doxorrubicina incubada durante 24, 48 e 72 horas e avaliada nas mesmas concentrações selecionadas (Tabela 14 & Figura 35).

Pode-se observar que a doxorrubicina na concentração de 1 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, manteve uma atividade citotóxica após 72 horas de incubação, uma vez que a viabilidade celular reduziu neste período. Nas concentrações de 0,1 e 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a atividade citotóxica da doxorrubicina diminuiu consideravelmente de 24 a 72 horas, demonstrando que estas concentrações não são eficazes.

Tabela 14 - Valores de viabilidade celular da doxorubicina na célula tumoral HepG2 após 24, 48 e 72 horas de incubação

Concentração $\mu\text{mol L}^{-1}$	% Viabilidade celular		
	24 horas	48 horas	72 horas
100	1,1	0,9	0,5
10	11,1	4,6	1,0
1	19,3	12,0	8,7
0,1	38,7	52,9	52,2
0,01	58,9	77,1	99,8

Figura 35 - Viabilidade celular da doxorubicina frente ao tempo de incubação para cada concentração selecionada na célula tumoral HepG2

Ao compararmos os valores de viabilidade celular para ambas as moléculas, pode-se observar que na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, tanto a YM-155 quanto a doxorubicina apresentaram quase a mesma atividade citotóxica frente à célula tumoral HepG2 ao final do período de 72 horas, com 8 e 9 % de células viáveis respectivamente. Enquanto, para a concentração de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, a YM-155 apresentou uma melhor atividade citotóxica ao final do período de 72 horas com 28 % de células viáveis na célula neoplásica do que a doxorubicina que apresentou 52 % de viabilidade celular no mesmo período de incubação. Isto ressalta a importância da YM-155 (e da classe dos inibidores da survivina) como moléculas de interesse para novas estratégias quimioterápicas.

4.7 Confirmação da atividade biológica em células V79-4 por citometria de fluxo

Os ensaios de citometria de fluxo foram realizados para as moléculas mais promissoras, dentre todas as avaliadas nos ensaios colorimétricos. A partir do padrão de dispersão do laser, tem-se a determinação da forma de molécula, onde o feixe que passa pela amostra e incide diretamente no detector é quantificado, levando a obtenção do parâmetro FSC na Figura 36. Outros dois parâmetros são a viabilidade celular (PM1) e quantificação de células nucleadas (PM2) a partir da fluorescência emitida por compostos adicionados em cada amostra. Cada evento detectado corresponde a uma célula ou fragmento de célula que são diferenciadas de acordo com um padrão compostos pelos três parâmetros descritos acima. As células mortas que se fragmentaram possuem baixo valor de FSC, PM1 e PM2; as células mortas, mas ainda intactas, apresentam altos valores de FSC, PM1 e PM2; já as células vivas possuem altos valores de FSC e PM2 e baixo valor de PM1. As células em processo de apoptose avançado são caracterizadas entre os padrões de células vivas e mortas, conforme observado na Figura 36.

Os resultados obtidos confirmaram os estudos colorimétricos, onde o composto YM-155 foi menos citotóxico do que a doxorrubicina nas células V79-4, testados nas mesmas faixas de concentrações usadas para os estudos de dose-resposta (Figura 36). Os compostos NEQUIMED também foram testados, com confirmação dos dados apresentados nos estudos colorimétricos.

A estratégia de uso de duas técnicas distintas para detecção da resposta biológica é muito importante para aumentar a confiabilidade nos dados obtidos a partir dos ensaios celulares descritos neste trabalho. Como próxima etapa deste trabalho, tem-se a confirmação dos dados para as células HepG2. Para o caso de compostos já descritos na literatura, como YM-155, já se tem uma confirmação externa dos ensaios.

Figura 36 – Padrão celular normal na linhagem V79-4

Controle

5 CONCLUSÕES

Os ensaios celulares são ferramentas de grande valia para a caracterização da atividade biológica de moléculas com interesse farmacológico. Essas informações são usadas para guiar o planejamento e modificação estrutural de novas moléculas bioativas.

Neste contexto, os ensaios usando a linhagem de células de fibroblasto (V79-4) determinaram a atividade citotóxica das moléculas em um ensaio fenotípico, voltado para a caracterização inicial da atividade tóxica. Os estudos com a linhagem de câncer de fígado (HepG2) estabeleceram a atividade anticancerígena de moléculas de referência e compostos NEQUIMED.

O estudo com compostos citotóxicos para V79-4 levou a obtenção de um banco de dados de espectro de atividade tóxica de moléculas diversas, que poderá ser usado como referência para caracterizar este tipo de atividade para as novas moléculas bioativas, juntamente com compostos com atividade anticancerígena e antiparasitária descrita. Esta informação será usada para as novas moléculas em estudo, uma vez que a atividade tóxica é um parâmetro de extrema importância para o desenvolvimento de um projeto em química medicinal.

Dentre as novas moléculas testadas, Neq385 foi a melhor molécula obtida, com seletividade para a célula cancerígena em relação ao fibroblasto. Neq256 e Neq388 também se constituem como potenciais moléculas para futuro desenvolvimento, mesmo não sendo seletivas para as células de câncer de fígado. Conforme relatado no procedimento de testes *in vitro* desenvolvido pelo NIH,⁵⁹ moléculas com atividade anticancerígena apresentam maior citotoxicidade nos ensaios bidimensionais com fibroblastos, o que pode levar a uma interpretação errônea sobre a seletividade. Desta forma, tem-se como perspectiva a realização de estudos tridimensionais envolvendo as linhagens celulares para determinar a seletividade.

Os resultados da avaliação do composto YM-155 frente às duas linhagens celulares mostraram que esta é mais potente e seletiva que a doxorrubicina, inclusive quando realizado o ensaio para observar a atividade do composto após vários dias de sua retirada do meio de cultura. Desta forma, o planejamento de

novos inibidores da survivina é uma estratégia promissora para o tratamento de diferentes tipos de câncer, com a finalidade de incrementar a eficácia das estratégias quimioterápicas existentes. Os estudos nesta direção foram iniciados no NEQUIMED, onde moléculas estudadas por métodos computacionais foram recentemente adquiridas para teste biológico.

6 REFERÊNCIAS

- ¹ MONTANARI, C. A. Brazilian medicinal chemistry in the next decade. **Quimica Nova**, v. 23, n. 1, p. 134-137, 2000.
- ² PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford University Press, 2005.
- ³ THOMAS, G. **Medicinal chemistry : an introduction**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- ⁴ LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 855-861, 2004.
- ⁵ LEITÃO, A., Montanari, M. L. C., MONTANARI, C. A. Desenvolvimento de Fármacos. In: Carlos A. Montanari. Org. São Paulo: Edusp, 2011. p. 67-90.
- ⁶ GIACOMINI, K. M.; HUANG, S. M.; TWEEDIE, D. J.; BENET, L. Z.; BROUWER, K. L. R.; CHU, X. Y.; DAHLIN, A.; EVERS, R.; FISCHER, V.; HILLGREN, K. M.; HOFFMASTER, K. A.; ISHIKAWA, T.; KEPPLER, D.; KIM, R. B.; LEE, C. A.; NIEMI, M.; POLLI, J. W.; SUGIYAMA, Y.; SWAAN, P. W.; WARE, J. A.; WRIGHT, S. H.; YEE, S. W.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J.; ZHANG, L.; TRANSPORTER, I. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 215-236, 2010.
- ⁷ KREWSKI, D.; ACOSTA, D.; ANDERSEN, M.; ANDERSON, H.; BAILAR, J. C.; BOEKELHEIDE, K.; BRENT, R.; CHARNLEY, G.; CHEUNG, V. G.; GREEN, S.; KELSEY, K. T.; KERKVLIT, N. I.; LI, A. A.; MCCRAY, L.; MEYER, O.; PATTERSON, R. D.; PENNIE, W.; SCALA, R. A.; SOLOMON, G. M.; STEPHENS, M.; YAGER, J.; ZEISE, L.; ASSESS, S. C. T. T. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*, v. 13, n. 2-4, p. 51-138, 2010.
- ⁸ TRALAU, T.; LUCH, A. Drug-mediated toxicity: illuminating the 'bad' in the test tube by means of cellular assays? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 7, p. 353-364, 2012.
- ⁹ KOLA, I. The state of innovation in drug development. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 2, p. 227-230, 2008.
- ¹⁰ PARK, B. K.; BOOBIS, A.; CLARKE, S.; GOLDRING, C. E. P.; JONES, D.; KENNA, J. G.; LAMBERT, C.; LAVERTY, H. G.; NAISBITT, D. J.; NELSON, S.; NICOLL-GRIFFITH, D. A.; OBACH, R. S.; ROUTLEDGE, P.; SMITH, D. A.; TWEEDIE, D. J.; VERMEULEN, N.; WILLIAMS, D. P.; WILSON, I. D.; BAILLIE, T. A. Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 4, p. 292-306, 2011.
- ¹¹ PHILLIPS, B. W.; CROOK, J. M. Pluripotent Human Stem Cells A Novel Tool in Drug Discovery. **Biodrugs**, v. 24, n. 2, p. 99-108, 2010.
- ¹² ASTASHKINA, A.; MANN, B.; GRAINGER, D. W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, n. 1, p. 82-106, 2012.
- ¹³ SLATER, K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 70-74, 2001.

-
- ¹⁴ The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs): <http://www.nc3rs.org.uk/> (Acesso em 2/7/2013)
- ¹⁵ FAN, F.; WOOD, K. V. Bioluminescent assays for high-throughput screening. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 5, n. 1, p. 127-136, 2007.
- ¹⁶ XIA, M.; HUANG, R.; WITT, K. L.; SOUTHALL, N.; FOSTEL, J.; CHO, M. H.; JADHAV, A.; SMITH, C. S.; INGLESE, J.; PORTIER, C. J.; TICE, R. R.; AUSTIN, C. P. Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 3, p. 284-291, 2008.
- ¹⁷ HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 4, n., p. 140-143, 1907.
- ¹⁸ CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 15, n. 5, p. 516-U530, 1912.
- ¹⁹ PARKER, R. C. **Methods of tissue culture**. London: Pitman Medical, 1961.
- ²⁰ GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue Culture Studies of the Proliferative Capacity of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium. **Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 264-265, 1952.
- ²¹ FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- ²² WEN, Y.; YANG, S. T. The future of microfluidic assays in drug development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 1237-1253, 2008.
- ²³ YANG ST, N. R. 3D cultures for growing and studying cells. **Materials Today**, v. 10, n. 3, p. 56, 2007.
- ²⁴ MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- ²⁵ SCUDIERO, D. A.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T. H.; CURRENS, M. J.; SENIFF, D.; BOYD, M. R. Evaluation of a Soluble Tetrazolium Formazan Assay for Cell-Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor-Cell Lines. **Cancer Research**, v. 48, n. 17, p. 4827-4833, 1988.
- ²⁶ ROEHM, N. W.; RODGERS, G. H.; HATFIELD, S. M.; GLASEBROOK, A. L. An Improved Colorimetric Assay for Cell-Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt Xtt. **Journal of Immunological Methods**, v. 142, n. 2, p. 257-265, 1991.
- ²⁷ BUTTKE, T. M.; MCCUBREY, J. A.; OWEN, T. C. Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium Formazan Assay to Measure Viability and Proliferation of Lymphokine-Dependent Cell-Lines. **Journal of Immunological Methods**, v. 157, n. 1-2, p. 233-240, 1993.
- ²⁸ MARSHALL, N. J.; GOODWIN, C. J.; HOLT, S. J. A Critical-Assessment of the Use of Microculture Tetrazolium Assays to Measure Cell-Growth and Function. **Growth Regulation**, v. 5, n. 2, p. 69-84, 1995.

-
- ²⁹ MICHAEL V. BERRIDGE, P. M. H., AND AN S. TAN. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual Review**, v. 11, n., p. 127-152, 2005.
- ³⁰ BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (Mtt) - Subcellular-Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron-Transport in Mtt Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.
- ³¹ BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 380, n. 1, p. 108-116, 2000.
- ³² BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. **Cytometry**, v. 47, n. 4, p. 236-242, 2002.
- ³³ DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p. 151-185, 2003.
- ³⁴ AN, W. F.; TOLLIDAY, N. Cell-Based Assays for High-Throughput Screening. **Molecular Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 180-186, 2010.
- ³⁵ BURNS, S.; TRAVERS, J.; COLLINS, I.; ROWLANDS, M. G.; NEWBATT, Y.; THOMPSON, N.; GARRETT, M. D.; WORKMAN, P.; AHERNE, W. Identification of small-molecule inhibitors of protein kinase B (PKB/AKT) in an AlphaScreen (TM) high-throughput screen. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 822-827, 2006.
- ³⁶ SUDO, K., YAMAJI, K., KAWAMURA, K., ET AL. Hight-hroughput screening of low molecular weight NS3-NS4A protease inhibitors using a fluorescence resonance energy transfer substrate. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 16, n. 6, p. 385-392, 2005.
- ³⁷ SWANEY, S.; MCCROSKEY, M.; SHINABARGER, D.; WANG, Z. G.; TURNER, B. A.; PARKER, C. N. Characterization of a high-throughput screening assay for inhibitors of Elongation Factor P and ribosomal peptidyl transferase activity. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 736-742, 2006.
- ³⁸ ALLEN, M.; REEVES, J.; MELLOR, G. High throughput fluorescence polarization: A homogeneous alternative to radioligand binding for cell surface receptors. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 5, n. 2, p. 63-69, 2000.
- ³⁹ KUNAPULI, P.; LEE, S.; ZHENG, W.; ALBERTS, M.; KORNIENKO, O.; REBECCA, M. A. Identification of small molecule antagonists of the human mas-related gene-X1 receptor. **Analytical Biochemistry**, v. 351, n. 1, p. 50-61, 2006.
- ⁴⁰ MEIER P, F. A., EVAN G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 796-801, 2000.
- ⁴¹ MO, H. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.
- ⁴² KERR J.F., W. A. H. Y. C. A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

-
- ⁴³ ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.**, v. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.
- ⁴⁴ KUROKAWA, M.; KORNBLUTH, S. Caspases and Kinases in a Death Grip. **Cell**, v. 138, n. 5, p. 838-854, 2009.
- ⁴⁵ MORGAN, D. O. **The Cell Cycle: principles of control**. London, 2007. 297p.
- ⁴⁶ GARRETT, M. A. Cell cycle control and cancer. **Current Science**, v. 81, n. 5, p. 515-522, 2001.
- ⁴⁷ ELSAYED, Y. A.; SAUSVILLE, E. A. Selected novel anticancer treatments targeting cell signaling proteins. **Oncologist**, v. 6, n. 6, p. 517-537, 2001.
- ⁴⁸ MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. **Ann. Rev. Cell Devel. Biol.**, v. 13, n., p. 261-291, 1997.
- ⁴⁹ SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **J. Cancer Sci. Ther.**, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2010.
- ⁵⁰ SELBY, M. A. K. A. P. J. **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**. London: Oxford University Press, 2005. 552p.
- ⁵¹ KOLLER, F. L.; GEEVARGHESE, S. K.; GORDEN, D. L. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: current role and future opportunities. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, n. 32, p. 3265-3273, 2007.
- ⁵² FERLAY J, S. H., BRAY F, FORMAN D, MATHERS C AND PARKIN DM, Globocan 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide, in: W.H. Organization (Ed.), International Agency for Research on Câncer, Lyon, 2010.
- ⁵³ KEW, M. C. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. **Pathol. Biol.**, v. 58, n. 4, p. 273-277, 2010.
- ⁵⁴ CHUANG SC, L. V. C., BOFFETTA P. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. **Cancer Lett.**, v. 286, n. 1, p. 9-14, 2009.
- ⁵⁵ JEMAL, A.; CENTER, M. M.; DESANTIS, C.; WARD, E. M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 19, n. 8, p. 1893-1907, 2010.
- ⁵⁶ MCCLUNE, A. C.; TONG, M. J. Chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma. **Clin. Liver Dis.**, v. 14, n. 3, p. 461-476, 2010.
- ⁵⁷ TSUJI, K.; YASUI, K.; GEN, Y.; ENDO, M.; DOHI, O.; ZEN, K.; MITSUYOSHI, H.; MINAMI, M.; ITOH, Y.; TANIWAKI, M.; TANAKA, S.; ARII, S.; OKANOUE, T.; YOSHIKAWA, T. PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 198, n. 2, p. 118-125, 2010.
- ⁵⁸ BRUIX, J.; BOIX, L.; SALA, M.; LLOVET, J. M. Focus on hepatocellular carcinoma. **Cancer Cell**, v. 5, n. 3, p. 215-219, 2004.
- ⁵⁹ http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_cyto_guide.htm (Acesso em 2/7/2013)

-
- ⁶⁰ FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010. 676p.
- ⁶¹ HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 5, p. 703-710, 2004.
- ⁶² TODD, M. D.; LIN, X. D.; STANKOWSKI, L. F.; DESAI, M.; WOLFGANG, G. H. I. Toxicity screening of a combinatorial library: Correlation of cytotoxicity and gene induction to compound structure. **J. Biomol. Screen.**, v. 4, n. 5, p. 259-268, 1999.
- ⁶³ MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- ⁶⁴ REYNAUD D, D. P., SUTHERLAND M, NIGAM S, PACE-ASCIAC CR. Hepoxilin signaling in intact human neutrophils: biphasic elevation of intracellular calcium by unesterified hepoxilin A3. **Febs Lett.**, v. 446, n. 2-3, p. 236-238, 1999.
- ⁶⁵ SANTOS, N. C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; SALDANHA, C.; MARTINS-SILVA, J. Biochemical, biophysical and haemorheological effects of dimethylsulphoxide on human erythrocyte calcium loading. **Cell Calcium**, v. 31, n. 4, p. 183-188, 2002.
- ⁶⁶ LIU, J.; YOSHIKAWA, H.; NAKAJIMA, Y.; TASAKA, K. Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, n. 1, p. 63-74, 2001.
- ⁶⁷ DENKO, N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 9, p. 705-713, 2008.
- ⁶⁸ BARRANCO, S. C. Survival and Cell Kinetics Effects of Adriamycin on Mammalian Cell. **Cancer Res.**, v. 33, n. 1, p. 11-16, 1973.
- ⁶⁹ YOUNG, R. C. The anthracycline antineoplastic drugs. **N. Engl. J. Med.**, v. 305, n. 3, p. 139-153, 1981.
- ⁷⁰ MOMPALER, R. L. Effect of Adriamycin on DNA, RNA, and Protein Synthesis in Cell-free Systems and Intact Cells. **Cancer Res.**, v. 36, n., p. 2891-2895, 1976.
- ⁷¹ GIORDANETTO, F., KULL, B., DELLSÉN, A. Discovery of novel class 1 phosphatidylinositide 3-kinases (PI3K) fragment inhibitors through structure-based virtual screening. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** V. 21, n. 2, 829-835, 2011.
- ⁷² WILLEM, G.E.J., SCHOONEN, W. M. A. W., DE ROOS, J.A.D.M., DE'BITON, E. Cytotoxic effects of 100 reference compounds on Hep G2 and HeLa cells and of 60 compounds on ECC-1 and CHO cells. I Mechanistic assays on ROS, glutathione depletion and calcein uptake. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 4, p. 505-516, 2005.
- ⁷³ WILLEM, G.E.J., SCHOONEN, J. C. R. S., WESTERINK, W.M.A., JEAN HORBACH, G. Cytotoxic effects of 109 reference compounds on rat H4IIE and human HepG2 hepatocytes. III: Mechanistic assays on oxygen consumption with MitoXpress and NAD(P)H production with Alamar Blue™. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 3, p. 511-525, 2012.

-
- ⁷⁴ MITCHELL, J. B. REDOX GENERATION OF NITRIC OXIDE TO RADIOSENSITIZE HYPOXIC CELLS. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 42, n. 4, p. 795–798, 1998.
- ⁷⁵ SHIN, J. S. Cytoprotective activity of annphenone against oxidative stress-induced apoptosis in V79-4 lung fibroblast cells. **Cell Biol. Int.**, v. 32, n. 9, p. 1099-1107, 2008.
- ⁷⁶ KIM, B.-Y. effects of reactive oxygen species on proliferation of chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. **Free Radical Biol. Med.**, v. 30, n. 6, p. 686-698, 2001.
- ⁷⁷ MELO, P. D.; DURAN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. **Toxicol. Lett.**, v. 116, n. 3, p. 237-242, 2000.
- ⁷⁸ PETINARI, L.; KOHN, L. K.; DE CARVALHO, J. E.; GENARI, S. C. Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro. **Cell Biology International**, v. 28, n. 7, p. 531-539, 2004.
- ⁷⁹ ROSA, R. M.; PICADA, J. D.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P. Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 628, n. 2, p. 87-98, 2007.
- ⁸⁰ SARTORI, A. M. C.; IBRAHIM, K. Y.; WESTPHALEN, E. V. N.; BRAZ, L. M. A.; OLIVEIRA, O. C.; GAKIYAT, E.; LOPES, M. H.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. **Ann Trop. Med. Parasitol.**, v. 101, n. 1, p. 31-50, 2007.
- ⁸¹ RAUTH, A. M.; MELO, T.; MISRA, V. Bioreductive therapies: An overview of drugs and their mechanisms of action. **Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys.** v. 42, n. 4, p. 755-762, 1998.
- ⁸² YAN, X. F.; XIAO, H. M.; GONG, X. D.; JU, X. H. Quantitative structure-activity relationships of nitroaromatics toxicity to the algae (*Scenedesmus obliquus*). **Chemosphere**, v. 59, n. 4, p. 467-471, 2005.
- ⁸³ TOCHER, J. H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. **General Pharmacol.**, v. 28, n. 4, p. 485-487, 1997.
- ⁸⁴ KELLY, P. A.; GRUBER, S. A.; BEHBOD, F.; KAHAN, B. D. Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent. **Pharmacotherapy**, v. 17, n. 6, p. 1148-1156, 1997.
- ⁸⁵ MONDINO, A.; MUELLER, D. L. mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 3, p. 162-172, 2007.
- ⁸⁶ FAIVRE S, K. G., RAYMOND E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, n. 8, p. 671-688, 2006.
- ⁸⁷ CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 70, n., p. 369-413, 2001.
- ⁸⁸ AGARWAL, K.; MUKHERJEE, A.; SEN, S. Etoposide (VP-16): cytogenetic studies in mice. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 23, n. 3, p. 190-193, 1994.

-
- ⁸⁹ HOGSTRAND, K.; BOHME, J. DNA damage caused by etoposide and gamma-irradiation induces gene conversion of the MHC in a mouse non-germline testis cell line. **Mutation Res.**, v. 423, n. 1-2, p. 155-169, 1999.
- ⁹⁰ FURR, B. J. A. The Development of Casodex(TM) (bicalutamide): Preclinical studies. **European Urology**, v. 29, n., p. 83-95, 1996.
- ⁹¹ PAUL F. SCHELLHAMMER, J. W. D. An Evaluation of Bicalutamide in the Treatment of Prostate Cancer. **Clin. Prostate Cancer**, v. 2, n. 4, p. 213-219, 2004.
- ⁹² TRAN, C.; OUK, S.; CLEGG, N. J.; CHEN, Y.; WATSON, P. A.; ARORA, V.; WONGVIPAT, J.; SMITH-JONES, P. M.; YOO, D.; KWON, A.; WASIELEWSKA, T.; WELSBIE, D.; CHEN, C. D.; HIGANO, C. S.; BEER, T. M.; HUNG, D. T.; SCHER, H. I.; JUNG, M. E.; SAWYERS, C. L. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 787-790, 2009.
- ⁹³ COLNAGHI, R.; CONNELL, C. M.; BARRETT, R. M.; WHEATLEY, S. P. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 44, p. 33450-33456, 2006.
- ⁹⁴ NAKAHARA, T.; TAKEUCHI, M.; KINOYAMA, I.; MINEMATSU, T.; SHIRASUNA, K.; MATSUHISA, A.; KITA, A.; TOMINAGA, F.; YAMANAKA, K.; KUDOH, M.; SASAMATA, M. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. **Cancer Res.**, v. 67, n. 17, p. 8014-8021, 2007.
- ⁹⁵ IWASA, T.; OKAMOTO, I.; SUZUKI, M.; NAKAHARA, T.; YAMANAKA, K.; HATASHITA, E.; YAMADA, Y.; FUKUOKA, M.; ONO, K.; NAKAGAWA, K. Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 20, p. 6496-6504, 2008.
- ⁹⁶ KANWAR, R. K.; CHEUNG, C. H. A.; CHANG, J. Y.; KANWAR, J. R. Recent Advances in Anti-Survivin Treatments for Cancer. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, n. 15, p. 1509-1515, 2010.
- ⁹⁷ WEIYING FENG, A. Y., TAKANORI UEDA. YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 435, n. 1, p. 52-57, 2013.
- ⁹⁸ CHARETTE, N.; DE SAEGER, C.; HORSMANS, Y.; LECLERCQ, I.; STARKEL, P. Salirasib sensitizes hepatocarcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 and survivin-dependent mechanisms. **Cell Death Dis.**, v. 4, n., 2013