



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RENAN DA SILVA SANTOS

**POTENCIAL CITOTÓXICO DA QUINOXALINA SINTÉTICA, INTITULADA
PACP 08A, NA LINHAGEM DE CARCINOMA DE CÉLULAS NÃO
PEQUENAS DE PULMÃO NCI-H460**

FORTALEZA

2016

RENAN DA SILVA SANTOS

**POTENCIAL CITOTÓXICO DA QUINOXALINA SINTÉTICA, INTITULADA
PACP 08A, NA LINHAGEM DE CARCINOMA DE CÉLULAS NÃO
PEQUENAS DE PULMÃO NCI-H460**

Monografia submetida à
Coordenação do curso de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Manoel
Odorico de Moraes Filho.**

**Coorientador: MSc. Sarah Sant´
Anna Maranhão.**

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S238p Santos, Renan da Silva.

Potencial citotóxico da quinoxalina sintética, intitulada PACP 08A, na linhagem de carcinoma de células não pequenas de pulmão NCI-H460 / Renan da Silva Santos. – 2016.
42 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Coorientação: Profa. Ma. Sarah Sant'Anna Maranhão.

1. Quinoxalina. 2. Citotoxicidade. 3. Linhagem NCI-H460. 4. Necrose. I. Título.

CDD 570

RENAN DA SILVA SANTOS

**POTENCIAL CITOTÓXICO DA QUINOXALINA SINTÉTICA, INTITULADA
PACP 08A, NA LINHAGEM DE CARCINOMA DE CÉLULAS NÃO
PEQUENAS DE PULMÃO NCI-H460**

Monografia apresentada à
Coordenação do curso de Ciências
Biológicas como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas,
outorgado pela Universidade Federal
do Ceará e encontra-se à disposição
dos interessados na Biblioteca
Central da referida Universidade.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

MSc. Sarah Sant'Anna Maranhão (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Júlia Barbosa bezerra

Universidade Federal do Ceará (UFC)

RESUMO

O câncer é responsável por um número expressivo e crescente de óbitos em todo o mundo, e representa a segunda causa de morte da população mundial. Os produtos sintéticos têm tomado cada vez mais espaço na pesquisa e na indústria farmacêutica devido a menor agressão ambiental e ao custo e tempo reduzidos de produção. As quinoxalinas pertencem à classe de compostos heterocíclicos do grupo das benzodiazinas, embora sejam raramente encontradas na natureza são facilmente sintetizadas. Em particular são empregados como fármacos de atividade antitumoral, antibióticos, antifúngico, anti-inflamatório, anticonvulsivante e antiprotozoários. O presente estudo avaliou os efeitos citotóxicos da quinoxalina intitulada PACP 08A sobre a viabilidade de células tumorais, utilizando em todos os experimentos, a doxorubicina como controle positivo. Os valores de CI_{50} obtidos, a partir do teste colorimétrico do MTT, variaram de $0.77\mu\text{M}$ até $27.11\mu\text{M}$ em HL-60 e HEPG-2, respectivamente. Foram utilizados oito linhagens celulares tumorais de origem humana e uma linhagem fibroblasto murinho (*Mus musculus*). A quinoxalina em questão apresentou seletividade para oito linhagens tumorais e não apresentou citotoxicidade em células normais mononucleadas do sangue periférico (CMSP) e tão pouco apresentou lise de membrana. Devido às altas incidências epidemiológicas e tratamento pouco seletivo existente ao câncer de pulmão, os seguintes experimento seguiram com a linhagem de carcinoma de células não pequenas de pulmão NCI-H460. A exclusão por Azul de Tripán mostrou que a CI_{50} é o dobro da mesma, $16\mu\text{M}$, apresenta efeito antiproliferativo, visto que exibem menos células do que o controle positivo. Os demais experimentos, coloração diferencial por LA/BE e coloração por Panótico rápido, corroboram entre si ao sugerirem que a Quinoxalina PACP 08A gera um processo de necrose como forma de morte celular nas doses supracitadas.

Palavras chaves: Quinoxalina, citotoxicidade, linhagem NCI-H460 e necrose.

ABSTRACT

Cancer is responsible for a significant and growing number of deaths worldwide and is the second cause of death of the world's population. Synthetic products have taken more space in the research and in the pharmaceutical industry due to less environmental damage and the cost and production time reduce. This study evaluated the cytotoxic effects of the quinoxaline entitled PACP 08A on the viability of tumor cells, using in all experiments, doxorubicin as a positive control. Quinoxalines belong to the class of heterocyclic compounds from the group of benzodiazinas, although rarely found in nature they are easily synthesized. In particular they are employed as antitumor drugs, antibiotics, antifungal, anti-inflammatory, anticonvulsant and antiprotozoal. The IC_{50} values obtained from the MTT colorimetric assay varied from $0.77\mu M$ to $27.11\mu M$ in HL-60 and HEPG-2, respectively. Eight cell lines were used tumor cell lines of human origin and a murine fibroblast line (*Mus musculus*). The quinoxaline showed selectivity to eight tumor lines and expressed no cytotoxicity in normal peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and also did not unfold membrane lysis. Due to the high epidemiological incidence and the lack of existing selective treatment to lung cancer, the following experiment followed with non-small cell lung cancer NCI-H460 lung. The exclusion of trypan blue showed that the IC_{50} and its twice, $16\mu M$, exhibited antiproliferative effect, since it got fewer cells than the positive control. The other experiments, differential staining by LA / EB and staining by Panotic fast corroborate each other suggesting that the PACP 08A quinoxaline generates a necrotic process as a form of cell death in the above treatments mentioned.

Keywords: Quinoxalines, cytotoxicity, NCI-H460 cell line, necrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma	11
Figura 2- Principais características da célula tumoral	15
Figura 3- Estrutura de uma quinoxalina (A). Reação de síntese de quinoxalina (B)..	19
Figura 4- Efeito da Quinoxalina PACP 08A sobre a viabilidade celular avaliado pelo método de coloração Azul de Tripán em células NCI-H460 após 48 horas de tratamento.	34
Figura 5- Efeito da Quinoxalina PACP 08A sobre a viabilidade celular avaliado por microscopia de fluorescência LA/BE em células NCI-H460 após 48 horas de tratamento	32
Figura 6- Micrografias de células NCI-H460 após coloração por kit Panótico rápido por 48h.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de linhagens celulares	22
Tabela 1- Efeito citotóxico <i>in vitro</i> da quinoxalina PACP 08A em linhagens de células tumorais após 72 h de tratamento.....	29
Tabela 3 - Efeito citotóxico <i>in vitro</i> da quinoxalina PACP 08A em linhagens de células tumorais após 48 h de tratamento.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysys of Variance (Análise de Variância)
DMSO	Dimetilsulfóxido
LA/BE	Laranja de Acridina/Brometo de Etídio
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
UV	Ultra-Violeta
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
CI50	Concentração Inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo

Sumário

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Câncer	11
1.2 Fisiopatologia do câncer	13
1.3 Principais tipos de morte celular	14
1.4 Produtos Sintéticos no tratamento do câncer	16
1.5 Quinoxalinas	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	188
3.1 Materiais	18
3.1.1 Equipamentos.....	18
3.2 Métodos	22
3.2.1 Avaliação da atividade citotóxica em células normais <i>in vitro</i> – MTT	24
3.2.2 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos ..	25
3.2.4 Avaliação da atividade antiproliferativa em células NCI-H460 através da exclusão por Tripan.	26
3.2.5 Análise morfológica- Coloração por Panótico rápido	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Citotoxicidade da Quinoxalina PACP 08A.....	30
4.2 Estudos dos efeitos da Quinoxalina em células da linhagem NCI-H460: proliferação e morfologia.....	32
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO.....	41
7 REFERÊNCIAS.....	411

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado a uma coleção de doenças que se relacionam e pode se originar em praticamente qualquer parte do corpo que apresente milhões de células (NCI, 2015). Os tumores malignos são responsáveis por um número expressivo e crescente de pacientes em todo o mundo, e representam a segunda causa de morte da população mundial, evidenciando que o câncer é um problema de saúde pública mundial (WHO, 2014).

Apenas em 2012 foram registrados 14 milhões de novos casos de câncer e 60% destes ocorreram na África, na Ásia e nas Américas Central e do Sul. Os óbitos devido à doença nesse ano ultrapassaram os oito milhões (WHO, 2014). Os gastos para os cuidados e tratamentos de pacientes com câncer nos Estados Unidos foram totalizados em 125 bilhões de dólares em 2010, contudo está previsto um aumento de 26 bilhões para 2020 (NCI, 2016).

No Brasil, a distribuição dos diferentes tipos de câncer sugere uma transição epidemiológica em andamento. Com o recente envelhecimento da população, que projeta o crescimento exponencial de idosos, é possível identificar um aumento expressivo na prevalência do câncer. Observando outros padrões da doença em relação a sociedade, é nítido o aumento da prevalência de cânceres associados ao melhor nível socioeconômico, como tumores de mama, próstata e cólon e reto, e incidência elevada de tumores geralmente associados à pobreza, colo do útero, pênis, estômago e cavidade oral (KOIFMAN & KOIFMAN, 2003).

As estimativas no país para o biênio 2016/2017 apontam a ocorrência de aproximadamente 600.000 novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema no país. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 420 mil novos casos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, intestino, colo

do útero, pulmão e estômago para o sexo feminino (Figura 1). São esperados um total de 214.350 casos novos para o sexo masculino e 300.870 para o sexo feminino (INCA, 2016).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos novos	%	Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

2016 por sexo, exceto pele não melanoma.

Fonte: INCA, 2016

Dentre todos os tipos, o câncer de pulmão é tido como o mais letal (JEMAL *et al*, 2008). Nos Estados Unidos, 14% das neoplasias registrados foram de pulmão no ano de 2011, representando 27% de mortes relacionadas ao câncer (American Cancer Society, 2012).

No Brasil, para 2016, estimam-se 17.330 de casos novos de câncer de traqueia, brônquios e pulmões entre homens e 10.890 entre mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 17,49 casos novos a cada 100 mil homens e 10,54 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

O principal fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer é o tabagismo, que aumenta em até trinta vezes o risco de se apresentar tal tumor em relação a não fumantes. Outros fatores também são relevantes para potencializar o aparecimento desse câncer, como a exposição a carcinógenos ocupacionais e ambientais (asbesto e sílica), a alguns metais e à poluição do ar. Além desses, repetidas infecções pulmonares, história de tuberculose, deficiência e excesso de vitamina A são considerados fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de neoplasia (INCA, 2016).

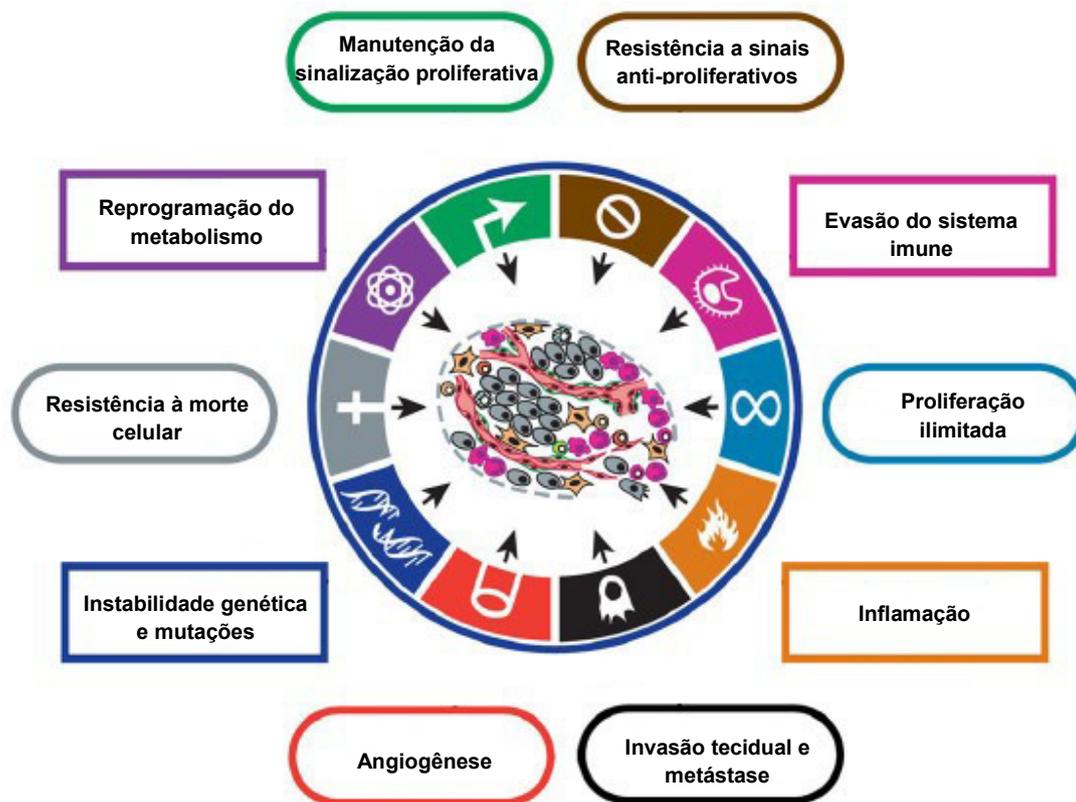
O câncer de pulmão é subdividido em dois tipos principais, os carcinomas de células pequenas e carcinomas de células não pequenas. Onde os primeiros são menos incidentes, estão relacionados a neoplasias do trato respiratório superior (traqueia e brônquios). O último faz referência as células

epitelia alveolares (células grandes), mais incidentes e mais nocivos (NCI, 2016).

1.2 Fisiopatologia do câncer

Em um artigo de revisão, Hanahan e Weinberg (2011) dissertaram sobre as características essenciais para a transformação maligna de uma neoplasia. Dentre as principais transformações fisiológicas que diferenciam células normais e tumorais estão a capacidade que essas têm sobre a resistência a sinais anti-proliferativos, evasão do sistema imunitário, proliferação ilimitada, inflamação, invasão tecidual e metástase, angiogênese, instabilidade genética e mutações, resistência a morte celular, reprogramação do metabolismo e manutenção da sinalização proliferativa (Figura 2).

Figura 2. Principais características da célula tumoral.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

A auto-suficiência nos sinais de proliferação são mediadas pelos oncogenes. Esses genes provocam o crescimento celular autônomo e são derivados de mutações de proto-oncogenes. Esses por sua vez apresentam múltiplos papéis, onde suas proteínas podem funcionar como ligantes e fatores de crescimento e transdutores de sinais relacionados com o crescimento e

proliferação. As oncoproteínas apresentam função similar ao seu equivalente normal, proteínas derivadas de proto-oncogenes, entretanto por estarem expressas constitutivamente, favorecem a célula com a sua auto-suficiência no crescimento (KUMMAR *et al.*, 2012).

Outro grupo de genes que caracterizam o microambiente do tumor são os genes supressores de tumor. Tal família de genes promove uma sensibilidade aos sinais inibidores do crescimento. Logo, a ausência de proteínas relacionadas é uma das alterações fundamentais no processo da carcinogênese (RANG *et al.*, 2012).

Existem muitos tipos de tratamento na terapia do câncer, onde as principais diferenças estão na origem tecidual da neoplasia e o estágio da progressão do tumor (NCI, 2015). Segundo a Sociedade Americana de Câncer (2016), as terapias atuais disponíveis incluem a associação entre técnicas como a quimioterapia, excisão cirúrgica, radiação terapêutica, imunoterapia, terapia hormonal, transplante de célula tronco e quimioterapia.

Infelizmente, muitos tumores ainda apresentam respostas moderadas aos protocolos clínicos, limitando a indicação e a eficácia do tratamento adjuvante para tumores e suas respectivas metástases (KUMMAR *et al.*, 2013). Portanto, torna-se fundamental encontrar, desenvolver e introduzir no arsenal médico modalidades terapêuticas mais eficientes que possam oferecer ao número crescente de pacientes com câncer a terapia mais adequada possível (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

1.3 Principais tipos de morte celular

Os complexos mecanismos e vias de controle de morte celular estão cada vez mais estudados e, mais do que nunca, os diferentes tipos de padrões de morte têm tido um papel crítico no controle de múltiplas doenças (KEPP *et al.*, 2011). Tendo em vista a relevância de se conhecer melhor esses padrões de morte celular, muitos autores vieram classificar esses diferentes perfis de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas, desde os mais clássicos, como apoptose, necrose e autofagia, até outros que ainda seguem em intensos estudos, como catástrofe mitótica, *anoikis*, entose, piroptose, paraptose, necroptose e netose (GALUZZI *et al.*, 2012; KEPP *et al.*, 2011).

A apoptose é a via de morte celular regulada por um programa intracelular muito específico, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA e suas proteínas citoplasmáticas (KUMAR *et al.*, 2012). Contudo não desencadeia processo inflamatório pois não ocorre liberação do conteúdo citoplasmático para o espaço extracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2014). Ela pode ocorrer em praticamente qualquer célula e é fisiologicamente muito importante para o desenvolvimento do organismo, desde o período embriológico até a manutenção da homeostasia (MAYUR *et al.*, 2013).

Como em outros padrões de morte celular, a definição morfológica da apoptose é extrema importância. Ela é caracterizada pela perda do contato célula-célula, encolhimento celular (picnose), condensação e fragmentação (cariorrexe) nuclear, formação de pequenas extensões membranares (*bleb*) e auto-fragmentação em corpos apoptóticos (MAYUR *et al.*, 2013).

Por muito tempo, a necrose foi interpretada como um mecanismo de morte celular acidental e vista com ausência de padrão morfológico (KROEMER *et al.*, 2009). Entretanto, sabe-se que a necrose, além de apresentar múltiplos papéis fisiológicos e patológicos, pode ser induzida por mediadores como citocinas e alquilantes de DNA (GALLUZZI *et al.*, 2012). As células necróticas apresentam características morfológicas distintas daquelas citadas pelas células apoptóticas, incluindo um citoplasma cada vez mais translúcido, inchaço de organelas citoplasmáticas, a condensação da cromatina em manchas circunscritas e irregulares, e um aumento em volume da célula (oncose) que culmina na ruptura mecânica da membrana do plasma (KEPP *et al.*, 2012).

O processo autofágico é um fenômeno comum envolvido na remoção de organelas danificadas durante a lesão celular, na remodelação celular que ocorre durante a diferenciação e homeostasia (KUMAR *et al.*, 2012). É tipicamente um processo de proteção e capacidade de mecanismo de citopreservação é corroborada com o fato de que a inibição genética ou farmacológica acelera o processo de morte (KEEP *et al.*, 2011). Contudo se hiperativada, frente a estímulos de estresse como deficiência nutricional,

hipóxia e estresse oxidativo, acaba levando a morte celular (MAYUR *et al.*, 2013). Fenotipicamente a autofagia é detectada pela manifestação maciça de vacúolos (KEPP *et al.*, 2011).

1.4 Produtos Sintéticos no tratamento do câncer

Produtos naturais têm desenvolvido um papel chave na terapia de muitas doenças. De fato, estima-se 40% de todos os medicamentos advêm de produtos retirados da natureza ou seus respectivos derivados sintéticos (JACOB *et al.*, 2009).

Para os grupos de pesquisa assim como para a indústria farmacêutica, a perda de espécies poderia reduzir a oportunidade de tratamentos através da redução de disponibilidade de se encontrar substância biologicamente ativas. Ou seja, existe uma preocupação com a obtenção do recurso na natureza, além disso, as drogas sintéticas apresentam um menor custo e tempo de desenvolvimento (LAHLOU, 2013).

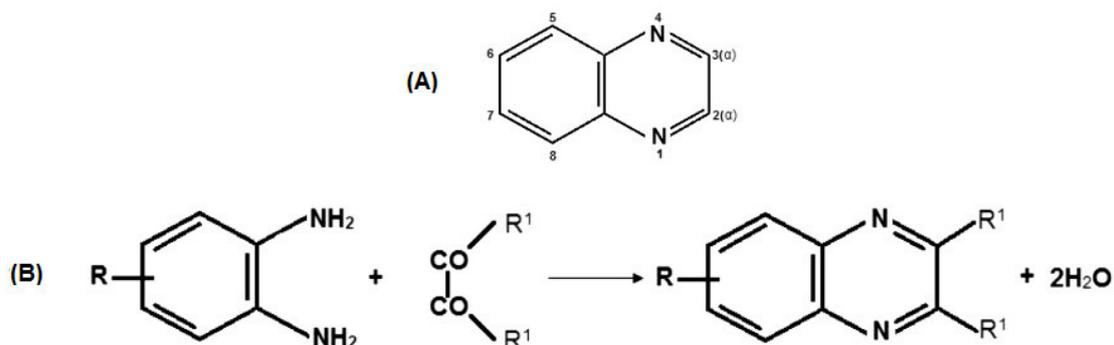
A terapia contra o câncer conta com um grande espectro de moléculas de origem natural. Mans *et al.* (1994) listou as fontes naturais e seus respectivos agentes, sendo alguns exemplos de drogas obtidas de plantas, a vincristina, o etopósido, o taxol e a camptotecina. A daunomicina, bleomicina, L-asparaginase, rioxina são derivadas de microorganismos enquanto a citarabina e briostatina são obtidas de esponja marinha e macro alga, respectivamente. Entretanto, análogos desses produtos foram sintetizados para melhorar a eficácia e perfil toxicológico. A carboplatina, por exemplo, foi desenvolvida como um análogo de cisplatina objetivando a redução da toxicidade renal, assim como a doxorubicina é um análoga de dounamicina que minimiza a cardiotoxicidade e o topotecano no lugar da camptotecina que facilita parâmetros farmacocinéticos (MANS *et al.*, 1994; NARANG & DESAI, 2009).

1.5 Quinoxalinas

As quinoxalinas pertencem a importante classe de compostos heterocíclicos do grupo das benzodiazinas. Tais moléculas são raramente encontradas na natureza, contudo são facilmente sintetizadas. Apresentam átomos de nitrogênio nas posições 1 e 4 do anel naftaleno e são formadas a

partir da união de um anel benzênico e de um anel pirazina (AJANI, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura de uma quinoxalina (A). Reação de síntese de quinoxalina (B).



Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2015.

A diversidade de tipos de quinoxalinas está relacionada às inúmeras cadeias laterais possíveis de serem adicionadas. A indústria farmacêutica já conhece o amplo espectro de atividade biológica dessa classe. Em particular são empregados como fármacos de atividade antitumoral, antibióticos, antifúngico, anti-inflamatório, anticonvulsivante e antiprotozoários (HUSAIN & MADHESIA, 2011; PEREIRA *et al.*, 2015).

As quinoxalinas sintéticas são moléculas pequenas e de baixo peso molecular e apresentam a capacidade de passar facilmente por membranas lipídicas. Essa capacidade é crucial para permitir a abrangência de utilidades, permitindo-as a alcançar patógenos intracelulares, alterar cascatas de reações e alterar aspectos relacionados à expressão gênica. Os alvos celulares têm sido elucidados nos últimos anos e incluem receptores de adenosina, receptores tirosina quinase, Akt e I κ B quinase e inibidores do receptor do fator de crescimento de fibroblasto (FGFR) (LIU *et al.*, 2016; TRISTÁN-MANZANO *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ❖ Avaliar os efeitos citotóxicos *in vitro* do derivado quinoxalínico sintético intitulado PACP 08 em células tumorais e não tumorais.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar as concentrações inibitórias mínimas de 50% da quinoxalina PACP 08A em linhagens de células neoplásicas e não tumorais.
- ❖ Determinar a atividade hemolítica da quinoxalina sintética PACP 08A em eritrócito.
- ❖ Avaliar as características morfológicas e efeito citotóxico da amostra PACP 08A em células tumorais da linhagem de carcinoma de células não pequenas de pulmão NCI-H460.
- ❖ Caracterizar o tipo de morte celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®

Agitador de tubo, Donner AD 8850®

Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di®

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212®

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206®

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin®

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®

Fluxo laminar, VECO®

Incubadora de células, (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®

High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter®

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070®

Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®

Microscópio de fluorescência, Olympus®

Pipetas automáticas, Gilson®

3.1.2 Soluções, Reagentes e Fármacos

Álcool Etílico	-	Vetec®
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma®
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1mg de brometo de etídio PBS q.s.p 10 mL de solução	Sigma®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina – fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará – ICC	-	Zodiac®
EDTA	-	Qeel®
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Laranja de Acridina	1 g de laranja de acridina (100 µg/mL) H ₂ O q.s.p. 10 mL de solução	Fluka®

Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10%, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM de HEPES	Cultilab®
MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma®
Penicilina – Estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab® Cultilab®
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85 %) 1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM) H ₂ O q.s.p 1 L de solução	Labsynth® Reagen® -
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de	Labsynth®

	sódio	
	2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O	Labsynth®
	0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O	Labsynth®
	H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5 %	Cultilab®
	0,125 g de EDTA	Proquímios®
	450 mL de PBS	-
Triton X -100	-	Isofar®
Xilol 10 %	100 mL de formaldeído	Dinâmica®
	H ₂ O q. s. p. 1 L	

3.2 Métodos

Foi realizado um total de cinco experimentos para o desenvolvimento desse trabalho. Inicialmente, através do ensaio do MTT frente a células tumorais e normais, foi identificado o valor de inibição média capaz de causar 50% do efeito máximo (CI₅₀) da Quinoxalina PACP 08A. Posteriormente foi realizado o ensaio hemolítico em células eritrocíticas para averiguar o potencial de lise da membrana celular. Os três últimos testes, exclusão por Azul de Tripán, coloração diferencial por Laranja de Acridina/Brometo de Etídio e coloração por Panótico rápido, foram realizados frente à linhagem NCI-H460 utilizando o valor de CI₅₀, seu dobro e sua metade com o intuito de predizer um possível mecanismo de morte celular.

3.2.1 Obtenção da Quinoxalina PACP 08A

A substância utilizada nesse estudo foi sintetizada e cedida pelo Professor Doutor Marcus Vinícius de Souza da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ). A estrutura e nome químico da molécula foram omitidos por questão de sigilo.

3.2.2 Cultivo de Células

Neste trabalho foi utilizado um total de nove linhagens celulares, dentre elas duas suspensas e sete aderidas (Tabela 1). As linhagens foram obtidas através de doação pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As células foram cultivadas em garrafas para cultura celular (Corning, 25 cm², volume de 50 mL e 75 cm², volume de 250 mL), utilizando meio de cultura RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) e meio DMEM exclusivamente na linhagem murina. As células foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Tabela 1. Lista de linhagens celulares.

Linhagem Celular	Tumor	Origem	Concentração de Plaqueamento (cel/ml)
HL-60*	Leucemia Promielocítica	Humana	3x10 ⁵
K-562*	Leucemia Mielóide Crônica	Humana	3x10 ⁵
PC-3	Adenocarcinoma de Próstata	Humana	2x10 ⁵
SF-295	Glioblastoma	Humana	1x10 ⁵
MCF-7	Adenocarcinoma de Mama	Humana	1x10 ⁵
HEPG-2	Carcinoma Hepatocelular	Humana	1x10 ⁵
L-929	Fibroblasto	Murino	1x10 ⁵
HCT-116	Carcinoma Colorretal	Humana	7x10 ⁴
NCI-H460	Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas	Humana	7x10 ⁴

* Linhagens suspensas.

3.2.3 Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais *in vitro*-MTT

A citotoxicidade da Quinoxalina PACP 08A foi avaliada, através do método do MTT. O método consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, para o formazan, de cor púrpura. Essa conversão do

MTT em formazan só ocorre em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima succinil desidrogenase presente nas mitocôndrias, o que permite desta forma a quantificação indireta da porcentagem de células vivas (MOSMANN, 1983).

Procedimento experimental

Para o ensaio do MTT as células foram plaqueadas segundo as concentrações encontradas na tabela 1. Em seguida foi adicionada a amostra PACP 08A numa concentração variando de 0,25 a 32 μ M, onde as placas foram incubadas por 72 e 48 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Depois de passado o período de incubação, as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes removidos. Em seguida, foram adicionados 150 μ L da solução de MTT (sal de tetrazolium) a 10%, e as placas foram incubadas por mais 3h. A absorbância foi medida, após dissolução do precipitado com 150 μ L de DMSO puro, em espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595nm.

Análise dos Dados

Os compostos foram testados em diluição seriada e suas CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e respectivos \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular foram calculados usando o programa *GraphPad Prism 6*.

3.2.4 Avaliação da atividade citotóxica em células normais *in vitro* – MTT

A citotoxicidade do composto PACP 08A em células normais foi avaliada através do ensaio de MTT, utilizando células mononucleadas de sangue periférico humano (CMSP), que contém linfócitos, monócitos e células da linhagem granulocítica.

Procedimento experimental

As células mononucleares de sangue periférico humano (linfócitos e monócitos) foram obtidas de voluntários saudáveis. A coleta do sangue foi realizada em frascos heparinizados por profissionais capacitados, nas

dependências da Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará (UNIFAC-UFC).

As células da linhagem NCI-H460 foram removidas, lavadas com tampão fosfato e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina para uma concentração final de 1×10^6 cél/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos. Após 24h do plaqueamento das células, a Quinoxalina PACP 08A foi adicionada nos poços, em concentrações seriadas, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Depois de 72h de pingado a droga, cada poço recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensado em 150µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595nm.

Análise dos dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism 6*. Cada amostra foi testada em triplicata em três experimentos independentes.

3.2.5 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos

Esta metodologia, segundo Costa-Lotufo *et al.* (2002), permite avaliar o potencial da substância teste em causar danos à membrana celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da membrana.

Procedimento experimental

As hemácias utilizadas foram provenientes de sangue de voluntário sadio. Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/ 5 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Esse experimento foi realizado em multiplacas com 96 poços, com a concentração da substância teste de 500 µM. Cada poço da primeira fileira recebeu 100 µL

da solução de salina. Na segunda, os poços receberam 90 µL de solução salina e 10 µL de DMSO, veículo de diluição da substância teste, usado como controle negativo. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 60 µL de solução salina e 40 µL de Triton X-100 1% (controle positivo). Da 4ª a 6ª fileira, foram adicionados 90 µL de solução salina e 10 µL da droga teste. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos 2% foram plaqueados em todos os poços, menos nos da 1ª coluna. Após incubação de 1 hora sob agitação constante à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), as amostras foram centrifugadas (1500 rpm/10 min) e o sobrenadante foi analisado.

Análise dos dados

O sobrenadante foi transferido para outra placa para a medida da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

3.2.6 Avaliação da atividade antiproliferativa em células NCI-H460 através da exclusão por Tripán.

O teste do Azul de Tripán permite quantificar separadamente as células viáveis e não viáveis, assim avaliando o efeito antiproliferativo da droga. Este teste foi aplicado nas células após tratamento de 48h com a quinoxalina PACP 08A.

O teste baseia-se na capacidade que o corante Azul de Tripán tem de penetrar em todas as células. Entretanto, apenas as células viáveis conseguem bombear o corante para fora, sendo possível, observar uma marcação azulada para as células não viáveis, que perderam essa capacidade (TENNANT, 1964).

Procedimento experimental

Células da linhagem NCI-H460 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,7 \times 10^5$ cél/mL, e incubadas, para adesão a placa, por 24h. Transcorrido esse tempo, as células foram incubadas com a Quinoxalina PACP 08A nas concentrações de 4 µM, 8 µM e 16 µM e comparadas ao controle negativo (grupo tratado com DMSO na mesma concentração do maior tratamento). A doxorrubicina (0,9 µM) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação (48 horas), o meio de cada

poço foi retirado e reservado em um microtubo. Em seguida cada poço foi lavado com 100 μL de PBS e as células foram tripsinizadas, sendo a mesma inativada pela solução reservada no microtubo. Em todas as etapas descritas, as soluções desses microtubo foram centrifugadas (2000 rpm/5 min). O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em 500 μL de PBS. Uma alíquota de 90 μL de suspensão de células foi retirada e misturada a 10 μL de Azul de Tripán. Em seguida uma alíquota de 10 μL da mistura foi colocada em uma câmara de Neubauer e, com a ajuda de um microscópio óptico, as células foram diferenciadas as células diferenciadas em viáveis e não viáveis.

Análise dos dados

O número de células contadas em cada experimento foi expresso como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes (realizados em triplicata). Para a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância two-way (ANOVA), utilizando o programa *GraphPad Prims 6*, seguido por teste Turkey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.2.7 Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

O método de coloração pelo brometo de etídio/laranja de acridina permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose (MCGAHON *et al.*, 1995). Este método baseia-se na revelação diferencial das células por fluorescência. A laranja de acridina (LA) é um corante capaz de atravessar membranas intactas e intercala-se ao DNA celular conferindo aparência verde ao núcleo. O brometo de etídio (BE), por sua vez, só consegue intercalar ao DNA e marcar o núcleo em vermelho se a membrana celular estiver danificada. Dessa maneira, as células viáveis, que tem a membrana íntegra, apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. As células em apoptose (membrana ainda íntegra) apresentam manchas verdes brilhantes (condensação da cromatina e fragmentação nuclear) e não são marcadas por BE. O BE é incorporado majoritariamente por células necróticas (membrana danificada) e apresentam, portanto, núcleo corado de vermelho (KUMMAR *et al.*, 2012).

Procedimento experimental

As células NCI-H460 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,7 \times 10^5$ cél/mL, e incubadas por 48 h com a Quinoxalina PACP 08A nas concentrações de 4 μ M, 8 μ M e 16 μ M e comparadas ao controle negativo (grupo tratado com DMSO na mesma concentração do maior tratamento). A doxorubicina (0,9 μ M) foi usada como controle positivo. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS (100 μ L), tripsinizadas (250 μ L de tripsina) e transferidas para tubo eppendorf, centrifugado por 5 min em 2000rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 60 μ L de solução de meio. Em seguida, 1 μ L da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo, e uma alíquota de 20 μ L dessas células foi transferida para uma lâmina. A lâmina foi montada com lamínula para contagem em microscópio de fluorescência. Foram contadas 300 células de cada amostra para a quantificação percentual dos eventos celulares (viáveis, apoptóticas e necróticas).

Análise de dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de dois experimentos independentes (realizados em triplicata). Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância two-way (ANOVA), utilizando o programa *GraphPad Prims 6*, seguido por teste Turkey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.2.8 Análise morfológica- Coloração por Panótico rápido

A coloração utilizada neste experimento permite verificar alterações morfológicas citoplasmáticas, nucleares e de membrana celular através do kit Panótico rápido. O teste baseia-se na capacidade que a solução de tiazinas tem de marcar o núcleo celular em azul, por ser um corante alcalino, aliada a

afinidade da solução de xantenos pelo citoplasma, por ser um corante ácido, conferindo-lhe uma coloração rósea.

Procedimento experimental

As células NCI-H460 foram plaqueadas em placas de 24 na concentração de 0.7×10^5 cél/mL, e incubadas por 48h com a Quinoxalina PACP 08A nas concentrações de 4 μ M, 8 μ M e 16 μ M e comparadas ao controle negativo (grupo tratado com DMSO na mesma concentração do maior tratamento). A doxorubicina (0,9 μ M) foi usada como controle positivo. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS (100 μ L), tripsinizadas (250 μ L de tripsina) e transferidas para um microtubo, centrifugado por 5 min em 2000rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 μ L de solução de meio. Transferiu-se 80 μ L da suspensão de células para um suporte que contém lâminas onde as células foram impregnadas utilizando centrifuga tipo *cytospin*. Para observar as características morfológicas das células, as lamínulas foram coradas em três passos do quite Panótico rápido. O primeiro passo dura 30 segundos e é composto por uma solução de triarilmetano, responsável pela fixação das células; o segundo passo apresentou duração de 20s e é composto por uma solução de xantenos; o terceiro, e último, passo com duração de 5s é composto por uma solução de tiazinas.

Análise dos dados

Lamínulas foram coladas às lâminas utilizando *entellan* e levadas ao microscópio óptico para avaliação das suas características morfológicas, comparando-as ao controle negativo (não tratado) e positivo. O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

4 RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade da Quinoxalina PACP 08A

O ensaio de citotoxicidade do MTT revelou que a Quinoxalina PACP 08A apresenta atividade citotóxica frente todas as linhagens tumorais estudadas. As CI_{50} identificadas para as linhagens tumorais, tratadas por 72h, variaram de 0.77 μ M a 27.11 μ M em HL-60 e HEPG-2, respectivamente, já a linhagem de fibroblasto murino (não tumoral) apresentou CI_{50} de 30.07 μ M. Observa-se que os menores valores de CI_{50} foram para as linhagens de HL-60, HCT-116 e NCI-H460, enquanto que a atividade em células mononucleadas de sangue periférico mostrou inibição média superior a 160 μ M. A doxorrubicina apresentando pouca variação entre as linhagens (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito citotóxico *in vitro* da quinoxalina PACP 08A em linhagens de células tumorais após 72 h de tratamento.

Linhagem	Origem	PACP 08A CI_{50} (μ M)	Doxorrubicina CI_{50} (μ M)
HL-60	Leucemia	0.77 ± 0.13	0,02 $\pm 0,00$
K-562	Leucemia	10.21 ± 0.69	0,46 $\pm 0,01$
PC-3	Próstata	8.32 ± 0.92	0,44 $\pm 0,1$
SF-295	S.N.C.	8.32 ± 0.51	0,25 $\pm 0,03$
MCF-7	Mama	16.53 ± 2.86	0,17 $\pm 0,01$
HEPG-2	Fígado	27.11 ± 3.32	0,21 $\pm 0,04$
HCT-116	Cólon	4.45 ± 0.38	0,11 $\pm 0,03$
NCI-H460	Pulmão	5,93 $\pm 0,32$	0.16 $\pm 0,01$
L-929	Fibroblasto	30.07 ± 9.96	0,66 $\pm 0,17$
CMSP	Sangue Periférico	>160	*ND

Os dados são apresentados em valores de CI_{50} μ M e o intervalo de confiança de 95% de realizados pelo método do MTT. *Não determinado

Para avaliar o comportamento da substância em estudo em relação ao tempo de incubação, repetiu-se o ensaio de MTT para as linhagens que apresentaram os menores valores de CI_{50} em um período de incubação de 48 horas. Com a redução do tratamento, observou-se uma singela variação dos valores de inibição para todas as linhagens, exceto para SF-295, onde seu valor de CI_{50} mais que dobrou (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito citotóxico *in vitro* da quinoxalina PACP 08A em linhagens de células tumorais após 48 h de tratamento.

Linhagem	Origem	PACP 08A CI_{50} (μ M)	Doxorrubicina CI_{50} (μ M)
HL-60	Leucemia	1,14 \pm 0,01	0,60 \pm 0,01
K-562	Leucemia	8,26 \pm 1,12	0,92 \pm 0,03
SF-295	S.N.C.	18,58 \pm 1,58	0,92 \pm 0,26
HCT-116	Cólon	5,28 \pm 0,13	0,22 \pm 0,04
NCI-H460	Pulmão	7,5 \pm 1,07	0,94 \pm 0,08
L-929	Fibroblasto	24,40 \pm 2,14	2,32 \pm 0,03
CMSP	Sangue Periférico	>160	>8

Os dados são apresentados em valores de CI_{50} μ M e o intervalo de confiança de 95% de realizados pelo método do MTT.

Como indicado, a linhagem de carcinoma de pulmão de células não pequenas NCI-H460 apresentou sensibilidade aos efeitos citotóxicos da molécula, nos dois tempos de incubação. Para al, todos os estudos subsequentes foram realizados com esta linhagem celular, utilizando como concentrações testes os valores da CI_{50} (8,0 μ M), a metade do valor da CI_{50} (4,0 μ M) e o dobro da CI_{50} (16 μ M).

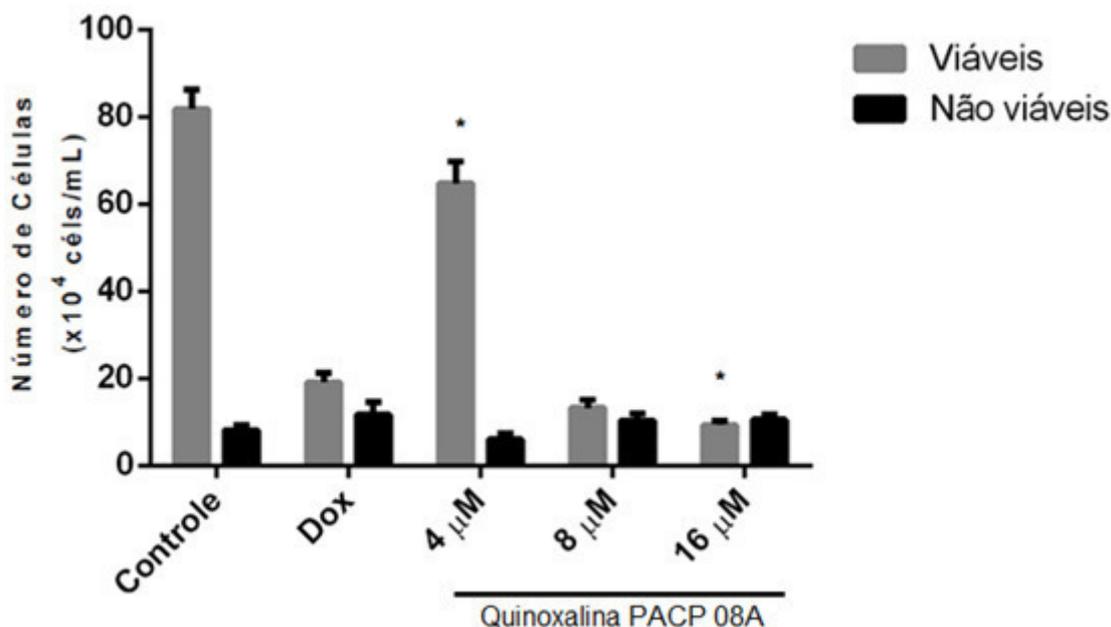
A ausência de atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos (CE_{50} > 500 μ M, dados não mostrados) sugere que a citotoxicidade da Quinoxalina PACP 08A não está relacionada a danos na membrana plasmática.

4.2 Estudos dos efeitos da Quinoxalina em células da linhagem NCI-H460: proliferação e morfologia

Com o intuito de caracterizar os efeitos antiproliferativos induzidos pela Quinoxalina PACP 08A na linhagem de células NCI-H460 foram avaliados a viabilidade celular e a morfologia celular após 48 horas de tratamento.

O teste de Azul de Tripán foi realizado com o objetivo de determinar a viabilidade celular. O gráfico (Figura 4) mostra abaixo mostra que para as concentrações de $8\mu\text{M}$ e $16\mu\text{M}$ houve clara redução da viabilidade celular, pois apresentam número de células inferior ao do controle negativo, dados que corroboram com as análises do MTT. O número de células não viáveis mostrou um padrão semelhante nos três tratados e também em ambos os controles. A doxorrubicina também, como esperado, apresenta um perfil de inibição de viabilidade.

Figura 4. Efeito da Quinoxalina PACP 08A sobre a viabilidade celular avaliado pelo método de coloração Azul de Tripán em células NCI-H460 após 48 horas de tratamento.

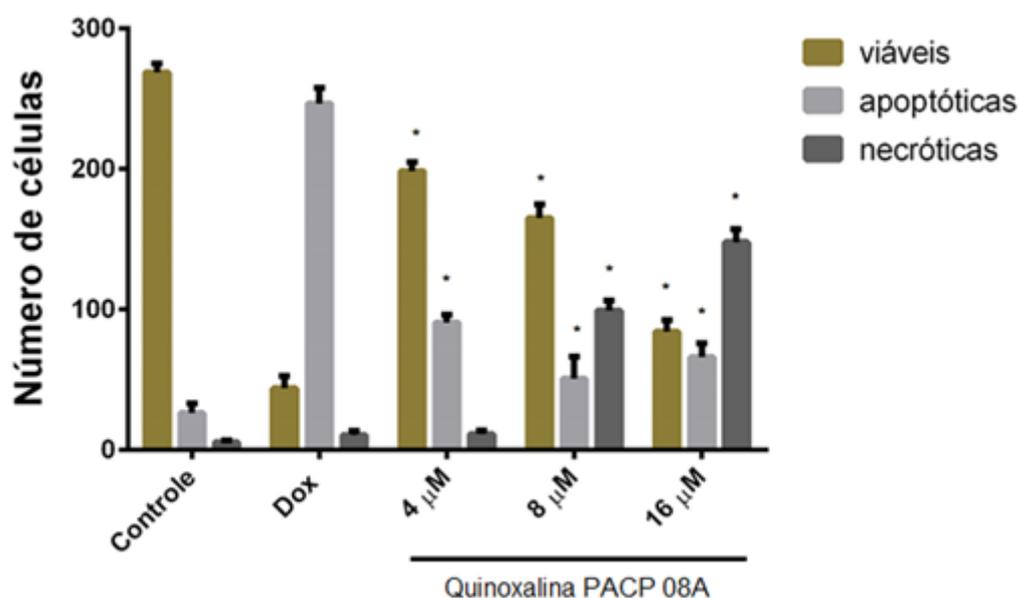


A doxorrubicina (Dox $0.9\mu\text{M}$) foi utilizada como controle positivo. *Houve significativa diferença ($p < 0.05$) quando comparado ao controle negativo. Análise por anova two-way ANOVA seguido por teste Turkey (*GraphPad Prims 6.0*). Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro padrão da média (E.P.M.) obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

A coloração diferencial por laranja de acridina e brometo de etídeo (LA/BE) possibilitou uma análise do padrão diferente de morte celular. Para os valores de $8\mu\text{M}$ e $16\mu\text{M}$ são observados mais de cem células com perfil

necrótico de morte, número superior daqueles visto em ambos os controles. entretanto a menor concentração utilizada apresentou um número significativamente alto de células viáveis quando comparada ao controle positivo. O controle com doxorubicina exibiu um número alto da quantidade de células apoptóticas, e singelo número de células viáveis e necróticas quando comparados a todos os tratados (Figura 5).

Figura 5. Efeito da Quinoxalina PACP 08A sobre a viabilidade celular avaliado por microscopia de fluorescência LA/BE em células NCI-H460 após 48 horas de tratamento.



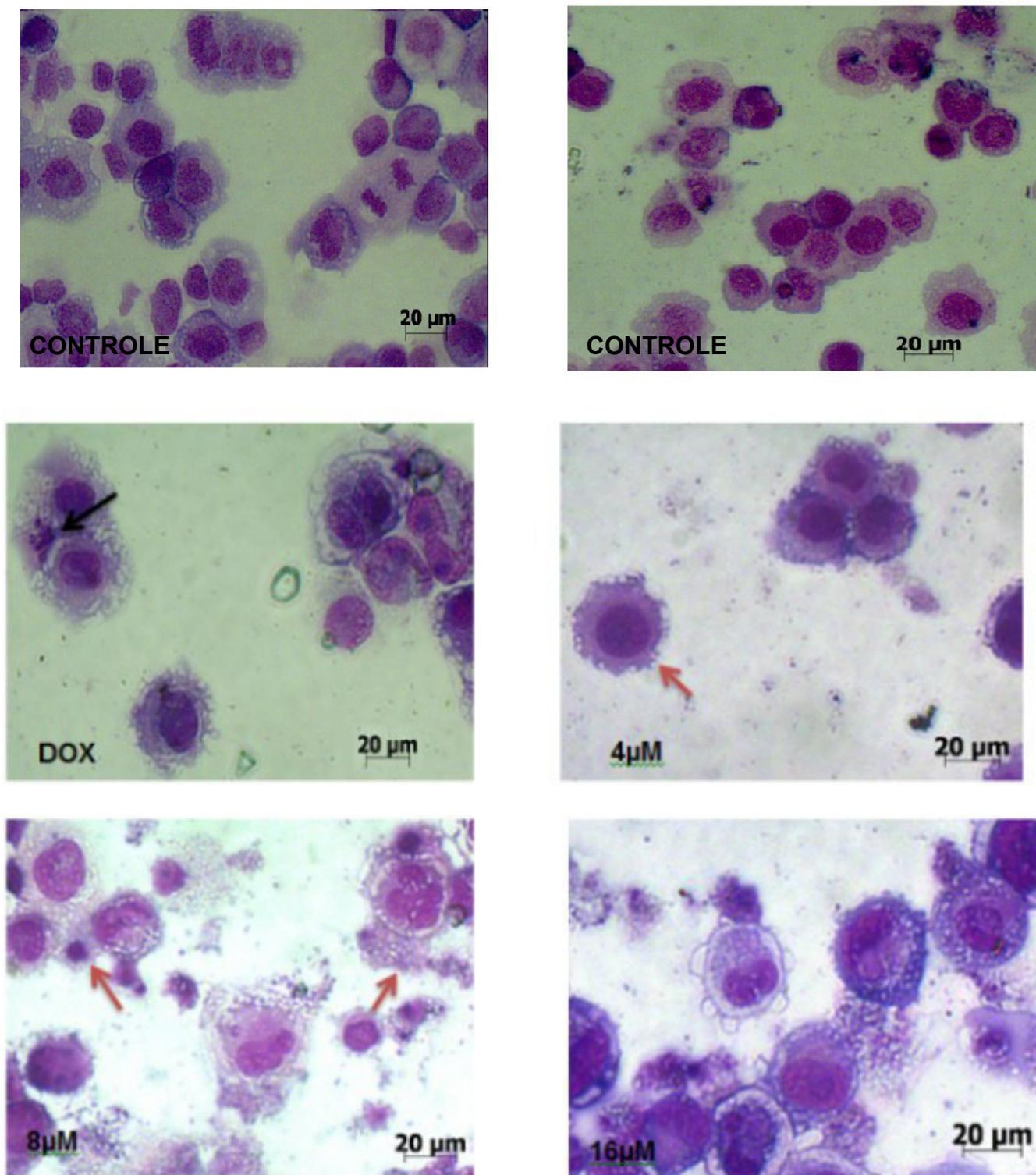
A doxorubicina (Dox 0.9µM) foi utilizada como controle positivo. *Houve significativa diferença ($p < 0.05$) quando comparado ao controle negativo. Análise por anova two-way ANOVA seguido por teste Turkey (*GraphPad Prims 6.0*). Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro padrão da média (E.P.M.) obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Mudanças morfológicas foram avaliadas utilizando a coloração por Panótico rápido, com o intuito de confirmar os padrões de morte celular observados na coloração por LA/BE. As lâminas obtidas do controle negativo apresentam células em divisão celular e com tamanho uniformizado. O tratamento com a doxorubicina mostrou células em possível processo apoptótico, onde é possível encontrar corpos apoptóticos e redução do tamanho celular.

No primeiro tratado, 4µM, observou-se pequenas modificações de membrana (*bleb*) e células com tamanho semelhante ao do controle negativo,

sugerindo um perfil apoptótico. Quando observados os tratamentos de 8 μ M e 16 μ M, apresentaram distorção do perfil morfológico característico celular, intensa vacuolização e aparente extravasamento do conteúdo citoplasmático, semelhante a um padrão de necrose (Figura 6).

Figura 6. Micrografias de células NCI-H460 após coloração por kit Panótico rápido por 48h.



Setas pretas indicam características apoptóticas e as setas vermelhas indicam características necróticas. Aumento de 200X.

5 DISCUSSÃO

As quinoxalinas são raramente encontradas na natureza, contudo sua fácil capacidade de síntese e diversidade de propriedades faz com que elas sejam de interesse na indústria química e farmacêutica (TRISTÁN-MANZANO *et al.*, 2015). Seu espectro de ação biológica já foi comprovado contra bactérias, fungos, vírus, leishimania, tuberculose, malária, depressão, disfunção neurológica, inflamação e câncer (PEREIRA *et al.*, 2014).

Os mecanismos de ação das quinoxalinas que apresentam atividade antitumoral descritos na literatura são amplos. Seus alvos incluem receptores do tipo tirosina cinase e receptores serina/treonina cinase (TRISTÁN-MANZANO *et al.*, 2015), inibição de topoisomerase I e topoisomerase II (PARRINO *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2003), inibição a mecanismos clássicos de resistência a quimioterápicos como glicoproteína-p e proteínas resistentes a multidrogas (MRP1) (LAWRENCE *et al.*, 2001) e inibição do fator indutor de hipóxia-1 (HIF-1) (GHATTAS *et al.*, 2014).

Nesse trabalho foram investigados os efeitos citotóxicos de uma quinoxalina sintética, aqui denominada de PACP 08A frente a um painel de oito linhagens tumorais diferentes, uma linhagem murina não tumoral e em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) provenientes de voluntários saudáveis.

Como controle positivo, a doxorrubicina foi utilizada em todos os experimento realizados durante esse estudo. A doxorrubicina é um antibiótico (antraciclina) citotóxico, inibidor de topoisomerase II, empregado como quimioterápico contra câncer de mama, de bexiga, osteossarcoma, sacoma de tecidos mole, múltiplos mieloma e linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, sendo considerado um representante de quimioterápico em uso no mercado (LIN, 2015; KATZUNG *et al.*, 2013).

Inicialmente, trabalhou-se com o ensaio de citotoxicidade do MTT. Tal ensaio, desenvolvido por Mosmann (1983), oferece uma mensuração simples, rápida e precisa da viabilidade celular e proliferação de linhagens de células aderidas e suspensas. A substância MTT é reduzida por desidrogenases mitocondriais em células vivas a um precipitado de formazan

colorido. A absorção de formazan dissolvido correlaciona-se com o número de células vivas intactas. Compostos citotóxicos são capazes de danificar e destruir as células e, assim, diminuir a redução de MTT para formazan (ULUKAYA *et al.*, 2008).

O resultado do ensaio do MTT mostrou que a Quinoxalina PACP 08A apresenta efeito tóxico frente a todas as linhagens tumorais testadas incubadas por 72 horas. O mesmo experimento, porém com a redução do tempo de incubação para 48 horas, demonstrou que os valores de inibição média (CI_{50}) foram alterados, a maioria para valores mais elevados. Fato este que induz indicar um possível efeito tempo dependente da substância PACP 08A em células não pequenas de carcinoma de pulmão. A oscilação referente a alteração do tempo de incubação também foi observada com o tratamento realizado com a doxorubicina, onde o valor de CI_{50} aumentaram no tempo de incubação de 48 horas.

A capacidade de compostos derivados de quinoxalinas apresentarem efeito citotóxico *in vitro* frente distintas linhagens celulares tumorais já foi visto por vários autores (PARRINO *et al.*, 2015; TRISTÁN-MANZANO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015). Parrino e colaboradores (2015) estudaram 17 quinoxalinas com distintos radicais e obtiveram como resultado que as mesmas foram ativas frente a um painel de 60 linhagens tumorais humanas, incluindo as linhagens NCI-H460, HCT-116, HL-60 e SF-295 também utilizadas neste trabalho. Padrão de concentração dependente de tempo também foi observado por Ghattas e colaboradores (2014) com derivados quinoxalínicos frente à linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama MCF-7.

Os valores de CI_{50} obtidos para a linhagem de fibroblasto murino L929 não tumoral exibem um efeito citotóxico singelo que também varia com a mudança do tempo de incubação. Entretanto, o resultado do MTT para com as células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) mostrou uma baixa atividade citotóxica nessas células ($>160\mu\text{M}$). A comparação entre os resultados da média dos valores de inibição média das células tumorais (média próxima de $10\mu\text{M}$) e CMSP (valor supracitado $>160\mu\text{M}$) demonstram um perfil citotóxico seletivo dezesseis vezes maior para as primeiras em relação às

células normais. Alguns autores em estudos anteriores demonstraram que compostos quinoxalínicos apresentavam afeitos citotóxicos mínimos frente a distintas linhagens de fibroblastos, murino e humano (MOHAREB *et al.*, 2016; TSENG *et al.*, 2016; AL-MARHABI *et al.*, 2015).

Com os resultados de efeito citotóxico frente ao painel de células tumorais e não tumorais e com a ausência de ruptura de membrana mesmo em uma concentração alta ($CE_{50} > 600 \mu M$), indicativos de uma possível atividade antitumoral não ligada ao rompimento de membrana, foram necessários mais estudo na tentativa de avaliar o perfil de ação da Quinoxalina PACP 08A. Para tal foi escolhido como modelo de estudo para os demais testes antiproliferativos e morfológicos a linhagem de carcinoma de células não pequenas de pulmão NCI-H460. Muito embora outras linhagens testadas aqui também tivessem CI_{50} com valores similares ou ainda menores, como HL-60 e HCT-116, a linhagem de pulmão foi escolhida devido às altas estatísticas apontadas para o câncer de pulmão e a falta de agentes com eficácia específica.

Segundo o INCA (2016), das neoplasias que podem ocorrer em ambos os sexos, os cânceres de cólon e reto e de pulmão são os mais incidentes no Brasil. Contudo, os tumores de pulmão estão entre os mais agressivos e sua alta letalidade é observada pelo fato de a detecção ser realizada em estágios mais avançados. Além disso, o carcinoma de pulmão de células não-pequenas chama a atenção por apresentar respostas modestas a todos os esquemas quimioterápicos disponíveis na clínica (COSTA-LATUFO *et al.*, 2010).

O ensaio de viabilidade celular de exclusão por Azul de Tripan, que consistiu na análise de células NCI-H460 após 48 horas de incubação, permitiu avaliar o perfil citotóxico através da redução do número de células viáveis. Esse ensaio mostrou significativa diferença do número de células viáveis da menor concentração em comparação com as outras duas concentrações testadas. O gráfico da figura 4 indica que a dose de $4 \mu M$ não apresentar caráter antiproliferativo acentuado, pois apresenta leve semelhança com o controle negativo (células sem tratamento). Contudo, as concentrações de $8 \mu M$

(valor aproximado da IC₅₀ da linhagem NCI-H460) e 16µM exibem intensa redução de células viáveis, chegando a um valor de aproximadamente vinte mil cél/mL, valor semelhante ao da doxorubicina. Para esse ensaio a substância em teste não demonstra perfil de dose dependência, tendo em vista que as duas maiores doses não apresentam diferença entre si. O número de células não viáveis também se manteve similar ao do controle negativo, não apresentando diferença significativa, o que poderia ser indicativo de um mecanismo antiproliferativo com inibição do crescimento celular.

Em estudos recentes, Loch-Neckel e colaboradores (2015) observaram que em moléculas híbridas, chalcona-quinoxalina, apresentaram um expressivo caráter antiproliferativo em células do sistema nervoso através de experimentos de formação de colônia, em 48 horas. Também em seu trabalho, Parrino *et al* (2015) mostrou uma potencial diminuição de células viáveis testadas contra sete tipos de linhagens diferentes de carcinoma de células não pequenas de pulmão, incluindo a NCI-H460, de novos compostos quinoxalínicos.

Na tentativa de identificar um possível perfil de padrão de morte celular foi realizado experimento como a coloração Laranja de Acridina (LA)/Brometo de Etídeo (BE), para microscopia fluorescente. As membranas citoplasmáticas e nucleares são permeáveis ao LA e, ao entrar em contato com esta substância as células são observadas na cor verde. Células mortas são coradas em laranja pelo BE, que só penetra em células com alteração de permeabilidade celular. Assim sendo, as membranas das células viáveis e apoptóticas precoces, que permanecem íntegras, permitem a passagem, somente do LA e se coram em verde. Por sua vez, as células necróticas e apoptóticas tardias, que apresentam perda da integridade da membrana, permitem a passagem do BE, sendo observadas na cor vermelha (MCGAHON *et al.*, 1995).

Com a análise do resultado da coloração de LA/BE pode-se observar pouca semelhança entre os tratamentos com a quinoxalina PACP 08A e o controle positivo (Figura 5). Nenhum dos três tratamentos apresenta intensa redução do número de células viáveis e também expressivo número de

células apoptóticas como encontrado com a doxorrubicina. O tratamento de 4 μ M foi o único que exibiu perfil necrótico estatisticamente semelhante ao do controle, enquanto as demais doses, 8 μ M e 16 μ M, apresentaram um aumento considerável do número de células em processo necrótico quando comparados ao controle ($p < 0.05$). Com esses números, credita-se que o processo de necrose possa ser o um padrão de morte celular encontrado em concentrações mais altas da quinoxalina PACP 08A quando em contato por 48h com células NCI-H460.

Na tentativa de analisar as alterações morfológicas mais proeminentes no núcleo e citoplasma das células tratadas com PACP 08A, a coloração por Panótico rápido foi utilizado como experimento (Figura 6). Os resultados gerados corroboraram com os achados do experimento da coloração de LA/BE. O controle negativo mostra a morfologia das células sem tratamento, exibindo atividade mitótica e padronização de tamanho. O menor tratado (4 μ M) se assemelha ao tratamento com a doxorrubicina por apresentarem evidências apoptóticas, como formação de *blebs* membrana e corpos apoptóticos, respectivamente. Os dois últimos tratamentos, CI_{50} e 16 μ M, as células apresentam características referentes a um possível processo necrótico, onde na primeira observamos retração nuclear (picnose) e em ambas são vistas células aumentadas de tamanho e material citoplasmático extravasado (lise de membrana) (GALLUZZI *et al.*, 2012; KEPP *et al.*, 2011).

Por sua vez, a indução de necrose por quinoxalinas já foi reportado. Como citado anteriormente as quinoxalinas apresentam potencial contra diversos parasitas e em seu estudo, Benítez e colaboradores (2014), identificaram o efeito necrótico de análogos quinoxalínicos frente à tripanossomatídeos.

Por muito tempo, a necrose foi considerada um mecanismo de morte celular meramente acidental. Atualmente, sabe-se que a necrose pode ocorrer de uma maneira regulada e apresenta um papel proeminente em processos fisiológicos e doenças. Essas descobertas têm levado ao interesse do desenvolvimento de indutores de necrose que podem ser úteis para o

tratamento de tumores resistentes as vias clássicas de apoptose (GALLUZZI *et al.*, 2012; KEPP *et al.*, 2011; LAWRENCE *et al.*, 2001).

6 CONCLUSÃO

A Quinoxalina sintética PACP 08A apresentou efeito citotóxico considerado seletivo frente ao painel de linhagens tumorais testadas quando comparado as células não tumorais PBMC e fibroblasto murino. A substância além de demonstrar seletividade para células tumorais em relação a células normais, não apresentou capacidade de lise celular. Seu caráter antiproliferativo foi evidenciado na CI_{50} e no dobro da mesma. Sugerimos nesse trabalho que provavelmente a quinoxalina estudada gera um processo de necrose nas células de carcinoma de pulmão quando tratadas por 48h nas concentrações 8 μ M e 16 μ M como foi vistos nos resultados de coloração por LA/BE e por Panótico rápido. Apesar dos resultado faz-se necessário mais estudos para que esse achado seja efetivado e para elucidar o mecanismo de ação da amostra.

7. REFERÊNCIAS

AJANI, O. *et al.* Present status of quinoxalines motifs: Excellent pathfinder in therapeutic medicine. **European J. Of Med. Chem.**, v. 85, p688-715, 2014.

AL-MARHABI, A.R. ABBAS, H.S. AMMAR, Y.A. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Some Quinoxaline Derivatives: A Promising and Potent New Class of Antitumor and Antimicrobial Agents. *Molecules* v.20, p.19805–19822, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/index>>. Acesso em: 23 de maio de 2016.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of Kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* óleo-resin. **Toxicon**, v.40, p. 1231-1234, 2002.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.1, p.47-58, 2010.

GAO, H. *et al.* DNA Sequence Specificity for topoisomerase II poisoning by the quinoxaline anticancer drug XK469 and CQS. **Molecular Pharmacology**, v.63, n.6, p.1382-1388, 2003.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclatures committee on cell death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v.19, p.107-120, 2012.

GHATTAS, K. *et al.* The quinoxaline di-N-oxide DCQ blocks breast cancer metastasis in vitro and in vivo by targeting the hypoxia inducible factor-1 pathway. **Molecular Cancer**, v.13, n.12, p.1-13, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HUSAIN, A.; MADHESIA, D. Recent advances in pharmacological activities of quinoxaline derivatives. **Journal of Pharmacy Research**, v.3, n.3, p.924-929, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2016**: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>> Acesso em: 23 de maio de 2016.

JACOB, P. *et al.* Is cancer risk of radiation workers larger than expected? **Occup Environ Med** v.66, p.789-796, 2009.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M. J. Cancer Statistics, 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v.58, p.71–96, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

LOCK-NECKEL, G. *et al.* In vitro and in vivo anti-glioma activity of a chalcona-quinoxaline hybrid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.90, p. 93-100, 2015.

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assay for drug discovery. **Nature Review Drug Discovery**, v.10, p.221-237, 2011

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**. v.16, n.1,p. 3–11, 2009.

KOIFMAN, S. KOIFMAN, R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. **Mutat Res**. 2003 Nov;544(2-3):305-11.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran Pathologic basis of diseases**, 9th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2013.

LAHLOU, M. The success of natural products in drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p.17-31, 2013.

LAWRENCE, N., LANGDON, T., BRENNAN, K., MARTINEZ ARIAS, A. Notch signaling targets the Wingless responsiveness of a Ubx visceral mesoderm enhancer in *Drosophila*. **Curr. Biol**. v.11, n.6, p. 375-385, 2001.

LIN, J.H. structure- and Dynamics-Based computational design of anticancer drug. **Biopolymers**, v.105, n.1, p.2-7, 2015.

LIU, Z. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of 3-vinyl-quinoxalin-2(1H)-one derivatives as novel antitumor inhibitors of FGFR1. **Drug Design, Development and Therapy**, v.10, p.1489–1500, 2016.

MAYUR, V. J. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **J. Cell. Mol. Med**. V.17, n.1, p. 12-29, 2013.

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol.**, v. 46, p. 153-185, 1995.

MOHAREB, R.M. *et al.* Synthesis and structure elucidation of some novel thiophene and benzothiophene derivatives as cytotoxic agentes. **Acta Pharmaceutica**. V.66, n.1, p.53–68, 2016.

MOSMANN, T. J. 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.

NARANG, A. S.; DESAI, D.S. Anticancer drug development: Unique aspects of pharmaceutical development. *Pharmaceutical Perspectives of câncer. Theurapeutcs*, 2009.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer>>. Acesso em: 22 de maio de 2016.

PEREIRA, J.A. *et al.* Quinoxaline, its derivatives and applications: A State of Art review. **European J. Of Med. Chem**, v. 97, p664-672, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 7th edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 778 p. 2012.

TENNANT, J. Evaluation of trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, v.2, n.6, 1964.

TRISÁN-MANZANO, M. *et al.* Quinoxalines potential totarget pathologies. **Current Medical Chemistry**, v.22, p.3075-6844, 2015.

TSENG C-Y, LIN C-H, WU L-Y, WANG J-S, CHUNG M-C, CHANG J-FI Potential Combinational Anti-Cancer Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer with Traditional Chinese Medicine Sun-Bai-Pi Extract and Cisplatin. **PLoS ONE** v.11, n.5, 2016.

ULUKAYA, E.; OZDIKICIOGLU, F.; ORAL, A. Y.; DEMIRCI, M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 1, p. 232–239, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). <<http://www.who.int/topics/cancer/en>> Acesso em: 22 de maio de 2016.