



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA STINGLIN ROSA RIBAS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE
DOS COMPOSTOS LQFM20 E LQFM23 EM CÉLULAS
HUH7 *IN VITRO***

MARIANA STINGLIN ROSA RIBAS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE
DOS COMPOSTOS LQFM20 E LQFM23 EM CÉLULAS
HUH7 *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilce Mara de Syllos
Cólus

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Roberta Losi-
Guembarovski

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ribas, Mariana Stinglin Rosa Ribas.

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS LQFM20 E LQFM23 EM CÉLULAS HuH7 IN VITRO / Mariana Stinglin Rosa Ribas Ribas. - Londrina, 2019.
90 f. : il.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Ilce Mara de Syllos Cólus Syllos Cólus .

Coorientador: Prof^ª Dr^ª Roberta Losi- Guembarovski Losi- Guembarovski .

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Avaliação da citotoxicidade, morte celular, migração celular e genotoxicidade - Tese.
2. dos compostos sintéticos LQFM20 e LQFM23 em células de hepatocarcinoma. - Tese. I. Syllos Cólus , Prof^ª Dr^ª Ilce Mara de Syllos Cólus . II. Losi- Guembarovski , Prof^ª Dr^ª Roberta Losi- Guembarovski . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

MARIANA STINGLIN ROSA RIBAS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DOS
COMPOSTOS LQFM20 E LQFM23 EM CÉLULAS HUH7 *IN VITRO***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade Estadual de
Londrina – UEL

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilce Mara de
Syllos Cólus
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Juliana Mara Serpeloni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Diego Luís Ribeiro
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto - FCFRP-USP

Londrina, 24 de abril de 2019.

Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que se não veem.

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque ele nos sustenta no momento da angústia, da dor, da dúvida, do medo..... e quando pensamos em desistir ele diz espera só mais um pouco aguenta que estou aqui e vou te ajudar.

À minha família que me apoia e incentiva em todas as decisões a continuar mesmo que para a conquista destes propósitos a distância seja necessária e nem possa estar presente em momentos especiais.

Ao Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, aos meus colegas de trabalho que fizeram parte deste trabalho me auxiliando, ensinando e tendo paciência nos momentos de dificuldade. Em especial à Beatriz B. Mattos, Monyse Nóbrega e Maiara Piva, pois elas me ensinaram como trabalhar com tudo que necessitei e nunca hesitaram em fazer.

Às professoras Dra. Ilce M. S. Cólus e Roberta Losi-Guembarovski, que confiaram no desenvolvimento deste trabalho mesmo sem me conhecer, e dispuseram-se do seu tempo para supervisão e orientação durante o período do mestrado.

Aos professores Dr^a Cássia Regina Primila Cardoso (UFMT), grupo de pesquisa do Laboratório de Química Farmacêutica (UFG) e Dr. Juliano Bordignon do Instituto Carlos Chagas (FioCruz- PR) que gentilmente nos cederam os compostos que foram utilizados no desenvolvimento deste projeto, bem como a linhagem celular.

À banca examinadora do trabalho de qualificação e defesa, Prof^a Dr^a Juliana Mara Serpeloni e Dr. Diego Luís Ribeiro, bem como os professores suplentes Dr^a Ana Flávia L. Specian e Dr. Eduardo J. A. Araújo, Prof^a Dr^a Rúbia Casagrande, pela presença e disposição do seu tempo para colaborar na melhora da qualidade deste projeto. E ainda Prof^a Dr^a Juliana Mara Serpeloni e Dr. Diego Luís Ribeiro, pelos ensinamentos que me foram passados durante a convivência durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e aos professores vinculados a ele, pelos ensinamentos e disponibilidade em nos capacitar como melhores profissionais de pesquisa e ensino.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

STINGLIN, Mariana Rosa Ribas. **Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos compostos LQFM20 e LQFM23 em células HuH7 *IN VITRO***. 2019. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O cilostazol e a milrinona são drogas inibidoras da fosfodiesterase 3, agentes vasodilatadores potentes usados para controlar doenças cardiovasculares. No entanto, a administração destes medicamentos pode levar a efeitos colaterais como cefaleia, taquicardia, palpitações, entre outras patologias relacionadas. Diante disto, há a necessidade de se investigar novos compostos que minimizem estes efeitos com mais efetividade terapêutica. Avaliando esta necessidade, a partir da hibridização molecular do cilostazol e da milrinona, foram desenvolvidos os protótipos LQFM20 e LQFM23, no Laboratório de Química Farmacêutica Médica (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Brasil. Estes compostos têm como principal característica diferirem molecularmente pela presença de diferentes radicais na unidade fenilpirazol, o que faz com que apresentem diferenças físicas e químicas como formulação empírica, peso molecular, ponto de fusão e rendimento de reação. Sabendo da importância de se avaliar o perigo de novos compostos o presente trabalho investigou a citotoxicidade, genotoxicidade, interferência na produção de espécies reativas e o processo de migração celular destes dois compostos em células HuH7 *in vitro*. Para avaliação da citotoxicidade foram realizados os ensaios de MTT, Vermelho Neutro (VN) e LDH com as concentrações seriadas entre 5 e 45µM. A partir dos resultados destes ensaios foram selecionadas concentrações citotóxicas para a quantificação de espécies reativas intracelulares (sonda CM-H₂DFCDA), morte celular (apoptose e necrose) e genotoxicidade (ensaio cometa). Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e posteriormente analisados por análise de variância (ANOVA), seguido de pós teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn. Nenhum dos compostos avaliados levou à diminuição de 50% da viabilidade celular nos ensaios de MTT e VN. O composto LQFM20, apenas na concentração de 30µM, induziu a citotoxicidade pelo ensaio do MTT; no ensaio do VN, a citotoxicidade ocorreu a partir de 15µM. O composto LQFM23 para HuH7 no ensaio MTT apresentou citotoxicidade à partir de 30 µM e no ensaio de VN à partir de 5 µM. No ensaio LDH, apenas LQFM23 demonstrou citotoxicidade significativa na concentração de 40µM. As avaliações de espécies reativas intracelulares, morte celular e genotoxicidade indicaram que os compostos avaliados não induziram danos. Contudo a atividade migratória da célula HuH7 foi inibida após 12 e 24 horas de tratamento com LQFM20 nas concentrações de 15µM e 40µM e com LQFM23 na concentração de 40 µM, o que sugere que ambos compostos possuem perfil a quimioterápicos para serem usados como co-adjuvantes no tratamento de hepatocarcinoma. Os resultados demonstraram que em nenhuma das concentrações estudadas os compostos LQFM20 e LQFM23, reduziram 50% da viabilidade celular, característica importante para possíveis fármacos de uso clínico. Diante dos dados obtidos e da ausência de relatos na literatura, sugere-se a realização de novas investigações para compreensão dos mecanismos de ação de ambos os compostos, que serão fundamentais para avaliar suas possíveis ações terapêuticas.

Palavras-Chave: Fosfodiesterase 3 (PDE3). MTT. Vermelho neutro. Lactato Desidrogenase. Apoptose. Cometa.

STINGLIN, Mariana Rosa Ribas. **Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of LQFM20 and LQFM23 compounds IN HuH7 cells in vitro.** 2019. 75pp. Dissertation (Master in Health Sciences) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Cilostazol and milrinone are phosphodiesterase 3 inhibitors, potent vasodilator agents used to control cardiovascular disease. However, the administration of these medications can lead to side effects such as headache, tachycardia, palpitations, among other related pathologies. In view of this, it is necessary to investigate new compounds that minimize these effects with more effectiveness than is therapeutic. Evaluating this need, from the molecular hybridization of cilostazol and milrinone, the prototypes LQFM20 and LQFM23 were developed at the Laboratory of Medical Pharmaceutical Chemistry (LQFM) of the Faculty of Pharmacy of the Federal University of Goiás, Brazil. These compounds have the main characteristic to differ molecularly by the presence of different radicals in the phenylpyrazole unit, which causes them to present physical and chemical differences as empirical formulation, molecular weight, melting point and reaction yield. Knowing the importance of evaluating the danger of new compounds, the present work investigated the cytotoxicity, genotoxicity, interference in the production of reactive species and the process of cell migration of these two compounds in HuH7 cells in vitro. To evaluate the cytotoxicity, the MTT, Neutral Red (VN) and LDH assays were performed with serial concentrations between 5 and 45 μM . From the results of these tests, cytotoxic concentrations were quantified for intracellular reactive species (CM-H2DFCDA probe), cell death (apoptosis and necrosis) and genotoxicity (comet assay). The results were statistically evaluated by the Shapiro-Wilk normality test and later analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test. Non-parametric data were evaluated by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. None of the compounds evaluated led to a 50% decrease in cell viability in the MTT and VN assays. LQFM20 compound, only at the concentration of 30 μM , induced cytotoxicity by the MTT assay; in the VN assay, cytotoxicity occurred from 15 μM . The compound LQFM23 to HuH7 in the MTT assay showed cytotoxicity from 30 μM and in the assay of VN from 5 μM . In the LDH assay, only LQFM23 demonstrated significant cytotoxicity at the concentration of 40 μM . Evaluations of intracellular reactive species, cell death and genotoxicity indicated that the compounds evaluated did not induce damage. However, the migratory activity of the HuH7 cell was inhibited after 12 and 24 hours of LQFM20 treatment at concentrations of 15 μM and 40 μM and with LQFM23 at the concentration of 40 μM , suggesting that both compounds have a chemotherapeutic profile to be used as adjuvants in the treatment of hepatocarcinoma. The results demonstrated that in none of the studied concentrations the compounds LQFM20 and LQFM23, reduced 50% of cellular viability an important characteristic for possible drugs of clinical use. Given the data obtained and the absence of reports in the literature, it is suggested to carry out new investigations to understand the mechanisms of action of both compounds, which will be fundamental to evaluate their possible therapeutic actions.

Keywords: Phosphodiesterase 3 (PDE3). MTT. Neutral Red. Lactate Dehydrogenase. Apoptosis. Comet

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1: | Diagrama esquemático da via de sinalização cAMP/ PDE3 em miócitos. | 2 |
| Figura 2: | Fórmula estrutural do 6- [4- (1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il) butoxi] -3,4-di-hidro-2 (1H) –quinolinona- cilostazol. | 5 |
| Figura 3: | Fórmula estrutural do 1,6-Di-hidro-2-metil-6-oxo (3-4'-bipiridino) -5-carbonitrilo –..... | 6 |
| Figura 4: | Síntese das moléculas LQFM, a partir de hibridização dos fármacos cilostazol e 2 milrinona. | 8 |
| Figura 5: | Estruturas moleculares dos compostos hibridizados LQFM20 (A) e LFM23(B). | 9 |
| Figura 6: | Redução enzimática de MTT para formazan pela ação das enzimas redutases e desidrogenases..... | 11 |
| Figura 7: | Morfologia da linhagem humanas de células de neuroblastoma e a presença de vesículas lisossomais com a presença do vermelho neutro (aumento de 1.600X)..... | 12 |
| Figura 8: | Representação da liberação do LDH intracelular e da conversão que permite sua quantificação por espectrofotometria. | 12 |
| Figura 9: | Etapas da formação do composto fluorescente DCF a partir da hidrólise e oxidação da sonda CM-H ₂ DCFDA..... | 14 |
| Figura 10: | Características morfológicas e coloração diferencial de células apoptóticas e..... | 16 |
| Figura 11: | Ensaio Cometa (A): tipos observados de acordo com a extensão do dano no DNA. (B): parâmetros utilizados na análise das imagens por software. | 19 |
| Figura 12: | Ensaio de cicatrização e migração – “Wound – healing”, com células de hepatocarcinoma humano – HUH7, com tratamento PBS (pH 7,0), período de 0 (A), 12(B) e 24(C) horas. Aumento de 20x..... | 20 |
| Figura 13: | Células da linhagem HuH7 – aumento de 20x..... | 22 |
| Figura 14: | Viabilidade de células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por..... | 28 |
| Figura 15: | Viabilidade de células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20 (A) e LQFM23 (B) por meio do ensaio de vermelho neutro. | 29 |
| Figura 16: | Avaliação da atividade da enzima lactato desidrogenase em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20(A) e LQFM23 (B). | 30 |

| | |
|--|----|
| Figura 17: Quantificação de ERs intracelular em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento de 1, 3, 12 e 24 horas com o composto LQFM20..... | 32 |
| Figura 18: Quantificação de ERs intracelular em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento de 1, 3, 12 e 24 horas com o composto LQFM23..... | 33 |
| Figura 19: Avaliação da genotoxicidade (parâmetros <i>Tail moment</i> (A), <i>Tail intensity</i> (B)) em células humanas de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento por 4 h com os compostos LQFM20..... | 34 |
| Figura 20: Avaliação da genotoxicidade (parâmetros <i>Tail moment</i> (A), <i>Tail intensity</i> (B)) em células humanas de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento por 4 h com os compostos LQFM23..... | 34 |
| Figura 21: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM20..... | 35 |
| Figura 22: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM20. Aumento 20x..... | 35 |
| Figura 23: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM23..... | 36 |
| Figura 24: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM20. Aumento 20x..... | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Características químico- físicas dos compostos LQFM20 e LQFM23..... | 8 |
| Tabela 2: Número de células HuH7 – viáveis, apoptóticas e necróticas, observadas no ensaio de Apoptose/Necrose, após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20 e LQFM23 | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------------------|---|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ATP | adenosina trifosfato |
| BE | brometo de etídio |
| Apaf1 | do inglês, <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i> cAMP adenosina monofosfato cíclico cGMP - guanosina monofosfato cíclico |
| CM-H ₂ DCFDA - 5- (e-6) | clorometil- 2', 7' diclorodidrofluoresceína diacetato acetil éster |
| DCF - 2'-7' | diclorofluoresceína |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNA | do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| EMA | do inglês, <i>European Medicines Agency</i> |
| ERs | espécies reativas |
| FAS | do inglês, <i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i> |
| FDA | do inglês, <i>Food and Drug Administration</i> |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrogênio |
| HUVEC | do inglês, <i>Human umbilical vein endothelial cell</i> |
| ICH | do inglês, <i>International Conference on Harmonisation</i> |
| LA | laranja de acridina |
| LDH | enzima lactato desidrogenase |
| LQFM | Laboratório de Química Farmacêutica Médica |
| MDA-MB-231 | Adenocarcinoma de glândulas mamárias – sitio metastático |
| MLKL | do inglês, <i>mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i> |
| MTT | do inglês (<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>) |
| NADH | do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> |
| NMP | do inglês, <i>normal melting point</i> |
| OECD | do inglês <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| ON | óxido nítrico |
| OPAS | Organização Pan-americana de Saúde |
| PBS | do inglês <i>phosphate buffered saline</i> |
| PDE3 | enzima fosfodiesterase 3 |
| PKA | proteína quinase A |
| P21 | proteína P21 |
| RIPK1 | do inglês <i>receptor interacting serine/threonine kinase 1</i> |

| | |
|--------------|---|
| RIPK3 | do inglês <i>receptor interacting serine/threonine kinase 3</i> |
| Sirt1 | proteína sirtuina 1 |
| tBID | do inglês <i>BH3 interacting domain death agonist</i> |
| TRADD | do inglês, <i>TNFRSF1A associated via death domain</i> |
| TRAIL | do inglês, <i>TNF-related apoptosis-Inducing ligand</i> |
| TNFR1 | do inglês <i>TNF receptor superfamily member 1</i> |
| TGF- β | do inglês <i>transforming growth factor beta</i> |
| TP53 | gene supressor tumoral <i>TP53</i> |
| VN | vermelho neutro |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | ENZIMA FOSFODIESTERASE 3 (PDE3) | 2 |
| 1.2 | FÁRMACOS VASODILATADORES | 4 |
| 1.2.1 | CILOSTAZOL..... | 4 |
| 1.2.2 | MILRINONA | 6 |
| 1.2.3 | FÁRMACOS DERIVADOS DE CILOSTAZOL E MILRINONA | 7 |
| 1.3 | ESTUDOS TOXICOLÓGICOS | 9 |
| 1.3.1 | ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR | 10 |
| 1.3.1.1 | ENSAIO DO MTT | 10 |
| 1.3.1.2 | ENSAIO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO (VN)..... | 11 |
| 1.3.1.3 | ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)..... | 12 |
| 1.4 | ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INTRACELULARES (ERs)..... | 13 |
| 1.5 | AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR - APOPTOSE E NECROSE | 14 |
| 1.6 | ENSAIO DE GENOTOXICIDADE | 17 |
| 1.6.1 | ENSAIO DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPAN | 17 |
| 1.6.2 | ENSAIO COMETA | 17 |
| 1.7 | ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO E MIGRAÇÃO - “WOUND-HEALING” | 19 |
| 2 | OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 21 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 21 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 4 | RESULTADOS | 28 |
| 5 | DISCUSSÃO | 37 |
| 6 | CONCLUSÕES | 64 |
| | REFERÊNCIAS | 65 |

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRASIL, 2017), as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo, representando 31% dos óbitos registrados em 2015, referentes a doenças crônicas não transmissíveis. Destes óbitos, estima-se que 7,4 milhões ocorram devido às doenças cardíacas e 6,7 milhões devido a acidentes vasculares cerebrais; a maioria acometeu pessoas com idade inferior a 70 anos e de países subdesenvolvidos, com renda baixa a média (BRASIL, 2017). No Brasil este quadro não difere dos dados observados no mundo; durante o ano de 2013, 40,9% dos óbitos foram causados por doenças cardiovasculares (BRASIL, 2015).

Pesquisas têm mostrado a forte associação das principais doenças crônicas não transmissíveis com fatores de risco altamente prevalentes, destacando-se o tabagismo, consumo abusivo de álcool, excesso de peso, níveis elevados de colesterol, baixo consumo de frutas e verduras e sedentarismo (BRASIL, 2014). Devido à existência e a relação direta entre estes fatores e casos de doenças cardiovasculares, a OMS em 2013 através do *“Global action plan for the prevention and control of NCDs 2013-2020”*, estabeleceu metas que visam reduzir o número de mortes prematuras em 25% até 2025 (BRASIL, 2017). Na tentativa de atingir estas metas os órgãos competentes nacionais e internacionais sugerem que se efetive a prevenção e o tratamento de doenças as cardiovasculares, bem como as enfermidades a elas relacionadas como a obesidade; e ainda evitando o uso nocivo do tabaco e álcool (BRASIL, 2017).

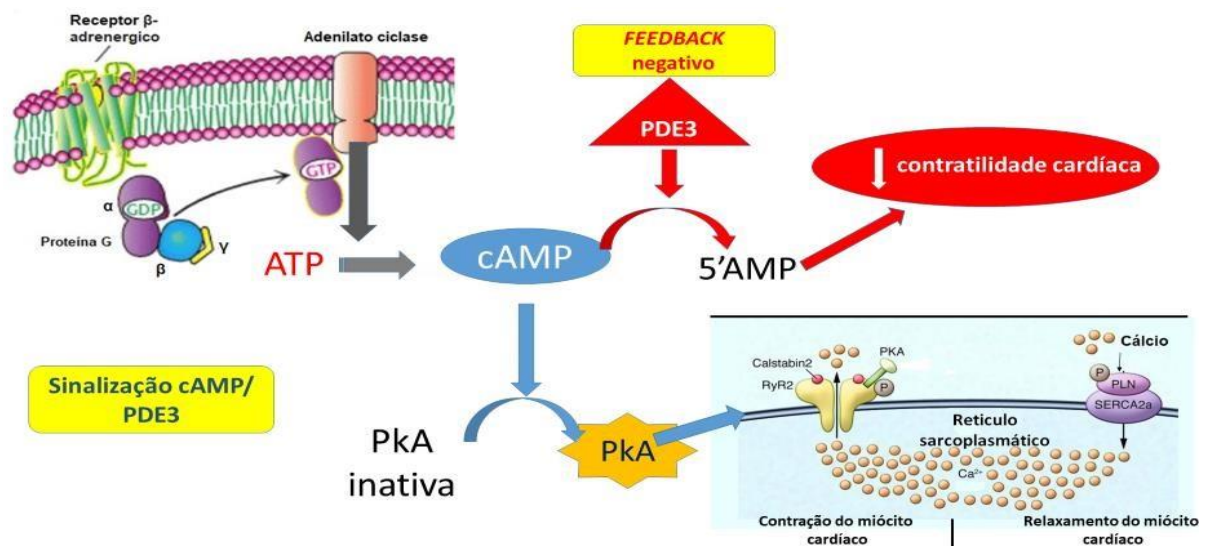
Tendo em vista esta preocupação dos órgãos competentes e o aumento na prescrição de medicamentos para o tratamento das doenças cardiovasculares, uma das formas de atuação dos fármacos utilizados neste controle é através da regulação do potencial de contratilidade do músculo cardíaco e da musculatura lisa do endotélio vascular. A ação desses medicamentos se faz através da indução ou inibição de estímulos hormonais e elétricos, regulação das atividades de segundos mensageiros das vias de sinalização da contratilidade muscular, controle intracelular de fluxo de íons, bem como a inibição de enzimas de controle das vias como as fosfodiesterases (IMAI et al., 2017; TANG et al., 2015).

1.1 ENZIMA FOSFODIESTERASE 3 (PDE3)

A enzima fosfodiesterase 3 (do inglês - *3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase* - PDE3) é uma enzima citoplasmática que se apresenta em duas isoformas codificadas por dois genes, PDE3A e PDE3B, com expressões diferentes nos tecidos. A enzima PDE3A é expressa no músculo liso do endotélio vascular, plaquetas e cardiomiócitos e a PDE3B em adipócitos, hepatócitos, cérebro e ducto coletor renal (RYBALKIN et al., 2003; OMORI; KOTERA, 2007). PDE3A regula processos como a contratilidade cardíaca, agregação plaquetária e relaxamento da musculatura lisa (FRANCIS; TURKO; CORBIN, 2001).

PDE3 é responsável pela regulação das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (BHOGAL; HASANE; GRORELK, 2018). As proteínas cAMP e o cGMP são segundos mensageiros intracelulares envolvidos na mediação do efeito vaso relaxante, regulando o controle da contratilidade e frequência cardíaca. cAMP tem como alvos intracelulares a proteína quinase A (PKA), em miócitos cardíacos. Esta proteína é um regulador primário associado à fosforilação de canais de cálcio que aumentam e aceleram sua saída do retículo sarcoplasmático estimulando a contratilidade da musculatura cardíaca (Figura 1) (ZACCOLO, 2009; GHIASI; ABDOLLAHI, 2012).

Figura 1: Diagrama esquemático da via de sinalização cAMP/ PDE3 em miócitos.



Fonte: adaptado de Marks, 2013.

Calstabin/ RyR2: PKA fosforila o receptor de rianodina 2 (RyR2), elevando a concentração de Ca²⁺ citosólico em cerca de dez vezes, estimulando a contração do músculo cardíaco.

PLN/ Serca2a: com o aumento do cAMP citosólico e ativação de PKA, os canais Serca2a são fosforilados e o Ca²⁺ é então bombeado de volta para retículo sarcoplasmático, o que diminui sua concentração, levando ao relaxamento do músculo cardíaco.

A fosforilação de PDE3 causada por agentes inibidores como milrinona e cilostazol, leva ao acúmulo de cAMP citoplasmático e, em consequência, ao aumento da contratilidade miocárdica, relaxamento do músculo liso vascular e inibição da agregação plaquetária (SHAKUR et al., 2001). Além destes, a interação PDE3- cAMP está envolvida em múltiplos aspectos da função cardíaca, como respostas inflamatórias, variações hormonais e neurotransmissores (FRANCIS; TURKO; CORBIN, 2001).

PDE3 ainda está envolvida em respostas a mecanismos intracelulares como diferenciação, sobrevivência e controle dos fatores de crescimento (MURATA et al., 2009; BEDIUNE et al., 2016). Azevedo et al. (2014) destacaram que a baixa expressão de PDE3 pode controlar mecanismos moleculares, tais como a proliferação de células, migração ou apoptose e até mesmo ter potencial na predisposição para tumores, especialmente em tecidos sensíveis ao cAMP, como próstata, endométrio, cólon, fígado, entre outros.

Estudos com células tumorais demonstraram que cAMP pode atuar no controle da proliferação celular. A ação de inibidores específicos de PDE3 resulta em um aumento no cAMP e bloqueio da proliferação de vários tipos de células (MURATA et al., 2009). Células de hepatocarcinoma humanos Hep3B e HuH7 apresentaram diminuição do crescimento celular quando na presença de inibidores de PDE3, como a cilostamida, demonstrando a importância de estudos com fármacos com esse potencial de ação como possíveis quimioterápicos (MURATA; TAIRA; MANGANIELLO, 1996). Dong et al. (2015) demonstraram que a regulação da via de sinalização cAMP através de inibidores de PDE3 como a milrinona, levou à inibição da migração de células de adenocarcinoma metastático de mama (MDA-MB-231) *in vitro*, sugerindo que os inibidores de PDE3 e de outras fosfodiesterases possam ser utilizados no tratamento dessa doença.

Drogas que inibem a agregação plaquetária como o cilostazol e a milrinona contribuem para o controle de um possível processo de metástase, pois a interação de células tumorais com plaquetas dentro da corrente sanguínea contribui para sua sobrevivência dentro da circulação, facilitando a migração e aderência em outros tecidos (MURATA et al., 2009; GIL-BERNABE; LUCOTTI; MUSCHEL, 2013; YU et al., 2014). A formação de trombos ao redor das células tumorais dentro da corrente sanguínea protege-as das células do sistema imune, evita sua morte e aumenta suas capacidades de adesão à parede do vaso, promovendo a transição epitelial-mesenquimal (LABELLE; BEGUM; HYNES; 2011; COUPLAND; CHONG; PARISH, 2012).

Efeitos prometastáticos das plaquetas foram até agora atribuídos à sua capacidade de adesão ou à sua capacidade de prevenir a morte de células tumorais na circulação. Tratamento neo-adjuvante com fármacos inibidores de PDE3, como o cilostazol, já apresentaram efeitos significativos no controle de carcinoma hepatocelular em ensaios *in*

vivo com o quimioterápico doxorubicina, mostrando-se eficaz no bloqueio de metástase por inibição da agregação plaquetária (IKEDA et al., 1998; CHOI et al., 2018).

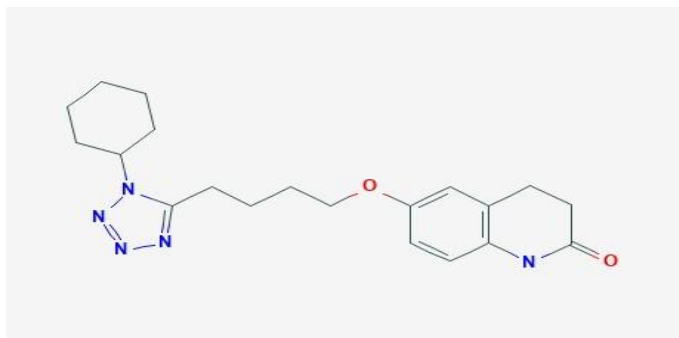
1.2 FÁRMACOS VASODILATADORES

1.2.1 CILOSTAZOL

Cilostazol, (6- [4- (1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il) butoxi] -3,4-di- hidro-2 (1H) – quinolinona) (Figura 2), é um fármaco desenvolvido na década de 80 no continente asiático para o tratamento de doenças cardiovasculares como aterosclerose, suspeitas de infarto agudo do miocárdio e em doenças vasculares como hemorragias intracranianas e trombozes (KIMURA et al., 1985; IMAI et al., 2017). Takagi et al. (2016) demonstraram que o tratamento com cilostazol em casos de acidentes vasculares cerebrais e em recorrências em modelo *in vivo* auxilia na proteção de proteínas de junção e de metaloproteinases presentes na matriz celular, contribuindo para a prevenção da formação de placas de aterosclerose e de reincidência de coágulos cerebrais (IMAI et al., 2017).

O cilostazol tem como principais características ação vasodilatadora, anticoagulante e de inibição da agregação plaquetária (ROSA; BARONI; PORTAL, 2006). Com formulação empírica, $C_{20}H_{27}N_5O_2$, e peso molecular 369,46 g/mol, apresenta-se na forma de cristal branco ou pó cristalino, facilmente solúvel em etanol e metanol e praticamente insolúvel em água (ANDRADE, 2018). O cilostazol é metabolizado pelas enzimas hepáticas do citocromo P450, principalmente a CYP3A4, com produção de dois metabólitos ativos, sendo que 3,4-deidro-cilostazol é responsável por representar pelo menos 50% da atividade farmacológica (ROSA; BARONI; PORTAL, 2006). A administração e uso do cilostazol pode apresentar efeitos colaterais, como cefaleia, taquicardia, palpitações e diarreia (DAWSON, 2001). Os estudos de Money et al. (1998) e Beebe et al. (1999) demonstraram que 1,7% dos pacientes tratados com o fármaco apresentaram cefaleia, sintoma adverso mais comum relatado na literatura.

Figura 2: Fórmula estrutural do 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il) butoxi]-3,4-di-hidro-2(1H)-quinolinona- cilostazol.



Fonte: PubChem a, 2019.

O cilostazol atua como inibidor da enzima fosfodiesterase 3 (PDE3), aumentando a cAMP presente nos trombócitos e células musculares lisas e diminuindo, assim, o cálcio intracelular que, por sua vez, provoca relaxamento celular e vasodilatação (SHRÖR, 2002). Ito et al. (2002) descreveram cAMP como segundo mensageiro responsável pela regulação positiva da proliferação celular, efeito antiproliferativo por levar ao processo apoptótico em músculos cardíacos de ratos. O acúmulo de cAMP, causado por cilostazol por meio da diminuição da atividade de PDE3, inicia uma série de eventos que incluem a regulação de genes supressores tumorais como *TP53* e *p21*, supressão de fatores de crescimento e diminuição da síntese de DNA. O aumento da proteína p53 bloqueia a progressão do ciclo celular e induz apoptose nas células musculares lisas vasculares cardíacas (HAYASHI et al., 2000; MORISHITA, 2005).

Os processos apoptóticos das células musculares lisas desempenham um papel importante na gênese de aterosclerose e restenose, portanto, a prevenção da lesão celular mediada pelo estresse oxidativo é uma área de investigação ativa (KOCKX, 1998). O potencial antioxidante do cilostazol foi demonstrado por Kim et al. (2002) e Lee et al. (2005), pois a presença do fármaco em ensaio *in vitro* com células de cordão umbilical humano (HUVEC) minimizou a produção de radicais hidroxila e peróxido, inibindo a morte por apoptose mesmo na presença de lipases lipoproteicas (indutoras de apoptose). OTA et al. (2009) e KABIL (2018) ao avaliar células HUVEC *in vitro* demonstraram que o tratamento com cilostazol reduziu a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) produzidas durante a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, houve diminuição de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas e o fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), além do aumento na expressão da proteína BCL-2 e supressão da expressão da proteína BAX, levando a um efeito antiapoptótico.

Ota et al. (2008) descreveram ainda atividade antioxidante do cilostazol através da regulação positiva proteica de *SIRT1*, responsável pela desacetilação de histonas,

impedindo a expressão de genes relacionados ao envelhecimento endotelial na presença de estresse oxidativo. Esta regulação gera o retardo da senescência celular endotelial, o que pode trazer benefício para a prevenção de doenças vasculares como a aterosclerose, visto que a presença do desequilíbrio redox está relacionada com a piora do quadro da doença.

1.2.2 MILRINONA

A milrinona, 1,6-Di-hidro-2-metil-6-oxo (3-4'-bipiridino) -5-carbonitrilo, assim como o cilostazol, é um fármaco vasodilatador, inibidor de PDE3, utilizado no tratamento de insuficiência cardíaca do tipo crônica congestiva no pós-operatório de cirurgia cardíaca ou em casos de insuficiência cardíaca avançada, como ponte para transplante (TANG et al., 2015). Com formulação empírica $C_{12}H_9N_3O$ e peso molecular 211,224 g/mol (Figura 3), é derivado do dimetil xantínico sintético e estruturalmente relacionado à teofilina e à cafeína. Apresenta-se na forma de cristal branco ou pó cristalino facilmente solúvel em metanol, clorofórmio e água, adquirindo uma coloração amarelada (PubChem b, 2019).

Os fármacos adrenérgicos como a milrinona têm sua ação cardiotônica aumentada e com maior tempo de relaxamento cardíaco frente a fármacos bipiridina (FLOREANI et al., 2003). Sua ação faz com que haja aumento da força de contração cardíaca, pois há menor degradação do cAMP, levando assim a um aumento da concentração de íons cálcio ionizados durante a sístole, com rápida captação de cálcio durante a diástole no músculo liso, provocando um decréscimo do cálcio disponível e melhorando a contratilidade do miocárdio (ALOUSI, JOHNSON, 1986).

Figura 3: Fórmula estrutural do 1,6-Di-hidro-2-metil-6-oxo (3-4'-bipiridino) -5-carbonitrilo – milrinona.



Fonte: PubChem b, 2019.

Apesar do uso frequente de milrinona na terapia de doenças cardíacas, algumas ressalvas são observadas em estudos relatados na literatura; um deles é a indução de arritmia cardíaca em pacientes que possuem insuficiência cardíaca aguda (DIBIANCO et

al.,1989). Portanto, pessoas com arritmias requerem atenção especial no uso de cardiotônicos, pois os elevados níveis de cálcio intracelular aumentam o consumo de oxigênio do miocárdio, levando à predisposição à isquemia miocárdica (MAJURE, 2013). O aumento do risco de taquiarritmias e fibrilação atrial está associado com um maior período de permanência em unidades de terapias intensivas e casos de mortalidade, principalmente pela presença de arritmia atrial e hipotensão após os procedimentos cirúrgicos cardíacos(INDOLFI et al., 1996; MATHEW et al., 2004).

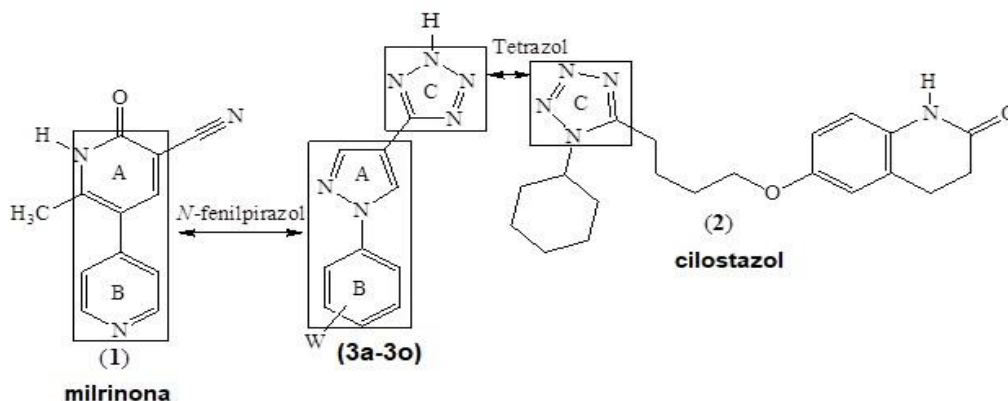
Apesar dos efeitos colaterais relatados, ainda se recomenda o uso da milrinona no pós-operatório para prevenção de novas patologias como a bradicardia (movimento cardíaco lento). Outra situação importante de uso é nos casos de cirurgia corretiva para a doença cardíaca congênita em crianças (MAJURE, 2013).

1.2.3 FÁRMACOS DERIVADOS DE CILOSTAZOL E MILRINONA

Os relatos acima citados de efeitos colaterais dos fármacos vasodilatadores cilostazol e milrinona, indicam a necessidade de se investigar novos compostos que levem a menores efeitos adversos com maior efetividade farmacológica. Avaliando esta necessidade, a partir da hibridização molecular (Figura 4) dos fármacos cilostazol (Figura 2) e milrinona (Figura 3) foram desenvolvidos no Laboratório de Química Farmacêutica Médica (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Brasil, alguns protótipos a fármacos, entre eles, LQFM20 – 5-[1-(4-fluorfenil)-1H-pirazola-4-il]-2H-tetrazola e LQFM23 - 5-[1-(3-clorofenil)-1H-pirazola-4-il]-2H-tetrazola. A hibridização manteve relação isostérica entre a subunidade *N*-fenilpirazola do composto 3a-3oe a subunidade fenil piridona da milrinona, o planejamento estrutural de LQFMs, e ainda foi complementado com a subunidade tetrazola presente no cilostazol (PAZINI, 2012).

As modificações do cilostazol e milrinona foram idealizadas para sintetizar fármacos com aspectos farmacológicos desejáveis e toxicidade mínima (OLIVEIRA et al.,2016). A adição de radicais como flúor no composto LQFM20 (Figura 5A) e a adição de um cloro em LQFM23 (Figura 5B) em diferentes carbonos da subunidade fenil peridona, tiveram como objetivo a mudança do perfil químico-físico dos compostos, obtendo-se as características listadas na Tabela1 (PAZINI, 2012).

Figura 4: Síntese das moléculas LQFMs, a partir de hibridização dos fármacos cilostazol e 2 milrinona.



Fonte: Pazini, 2012.

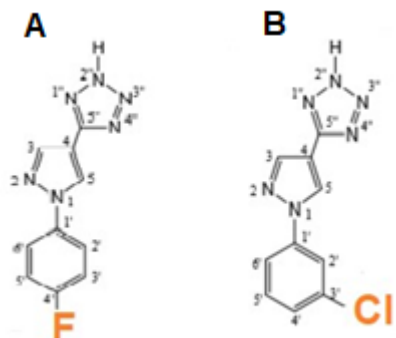
Tabela 1: Características físico-química dos compostos LQFM20 e LQFM23.

| Características | LQFM20 | LQFM23 |
|-----------------------|--|---|
| Fórmula empírica | C ₁₀ H ₇ FN ₆ | C ₁₀ H ₇ CIN ₆ |
| Peso molecular (g/mL) | 230,2 | 246,65 |
| Ponto de fusão (°C) | 115 | 222-225 |
| Rendimento de reação | 99% | 94% |
| Coloração | bege | bege |

Os compostos pirazólicos, como as moléculas LQFM20 e LQFM23, têm sido relatados como potenciais fármacos vasodilatadores com possíveis atividades antimicrobiana, antidepressiva, anticonvulsivante, antipirética, analgésica e anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2016). Pazini (2012), por meio de ensaios de avaliação da atividade farmacológica de compostos sintéticos, entre eles o LQFM20 e LQFM23, destacou o protótipo LQFM20. Este apresentou perfil vasodilatador *in vivo* no endotélio de aortas isoladas de ratos, não apresentou inibição seletiva através de canais de potássio e aumento de captação de cálcio pelo retículo endoplasmático, levando assim, à vasodilatação esperada, conforme os fármacos que deram origem a esta molécula. Neste mesmo estudo foram realizados testes de toxicidade *in vitro* (ensaio de vermelho neutro – VN) e *in vivo*, onde o protótipo LQFM20 apresentou sinais brandos de toxicidade quando administrado nas doses de 2000 mg/Kg, sendo classificado na classe 4 da OECD (2001) (do inglês, *Organization for Economic Cooperation and Development*). Esta classificação é baseada no guideline 423 OECD (2001), que determina faixas de exposição a um composto químico que levem à letalidade de 50% da população estudada em ensaios *in*

vivo. As classes variam entre 1 a 5, sendo 2 que a primeira se refere a risco agudo máximo (5mg/kg), e 5 a risco agudo mínimo (2000 – 3 5000mg/kg).

Figura 5: Estruturas moleculares dos compostos hibridizados LQFM20 (A) e LFM23(B).



Fonte: Pazini, 2012.

1.3. ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

Durante o ciclo de vida dos organismos vivos ocorre exposição a substâncias químicas como compostos industriais, corantes, fármacos e cosméticos, agrotóxicos ou radiações ionizantes e não ionizantes. Estes agentes químicos e físicos podem interagir como material genético levando a modificações deste e, se não houver reparo celular, ocasionar mutações. Estas podem envolver perda ou ganho de material genético (deleções e duplicações, que alteram os cromossomos) e mudanças em um único par de bases ou em diversas bases. Os agentes químicos e físicos que ocasionam estas mutações são classificados como mutagênicos (PARRY; PARRY, 2012; ABILEV; GLASER, 2013).

Os compostos mutagênicos podem interagir diretamente com a estrutura do DNA ou indiretamente, após serem metabolizados. Devido ao potencial risco à saúde representado pela exposição a substâncias mutagênicas, é importante que todos os compostos químicos para os quais haja possível exposição humana sejam rastreados quanto à atividade mutagênica. Se for detectado potencial mutagênico, os perigos de exposição podem ser avaliados, o uso do produto químico controlado e, quando apropriado, eliminado do mercado e do meio ambiente (KLAASSEN, 2012). Avaliação do potencial mutagênico é um passo crítico na avaliação da segurança de novos compostos químicos. Portanto, a avaliação da mutagenicidade e do perigo toxicológico requer atenção durante o processo de registro de produtos químicos industriais (JI; BALL; LeBARON, 2017).

A ICH (2008) (do inglês, *International Conference on Harmonisation*) destaca ainda a importância da avaliação do potencial genotóxico para compostos candidatos a medicamentos, anterior à exposição humana. Ensaio *in vivo* levam à diminuição de

possíveis resultados falsos negativos para os danos avaliados, assegurando assim, que pacientes não serão expostos a um perigo genotóxico (GALLOWAY, 2017).

Agências regulatórias internacionais exigem que os compostos sejam inicialmente avaliados usando ensaios *in vitro*. Nestes são mensuradas a capacidade citotóxica, indução de danos no DNA e a capacidade de reparo da célula (GILBERT, FRIEDRICH, 2017). As avaliações padrões recomendadas pela OECD (2015), baseiam-se nos ensaios de mutagenicidade em bactérias (teste de AMES), citogenéticos *in vitro* (ensaios de aberrações cromossômicas e do micronúcleo) e de genotoxicidade *in vivo* (ensaios do micronúcleo e cometa) (DHAWAN; BAJPAYEE, 2013; GALLOWAY, 2017).

1.3.1. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

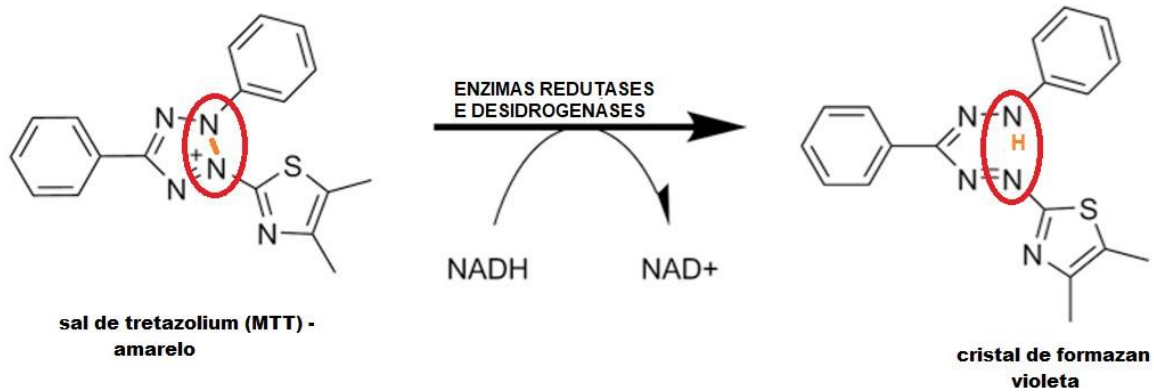
A citotoxicidade dos compostos deve ser avaliada para sua adequação em aplicações farmacêuticas e os ensaios de viabilidade celular fornecem ferramentas úteis para essa finalidade (PEREZ et al., 2017). Devido à existência de uma grande variedade de ensaios de viabilidade celular nos quais são utilizados métodos colorimétricos, a escolha de protocolos que averiguem diferentes parâmetros celulares, como metabolismo mitocondrial (ensaio de MTT), avaliação da integridade de membrana (ensaio LDH) e atividade lisossomal (vermelho neutro), propicia uma ampla avaliação dos possíveis potenciais de toxicidade de compostos testes (SPECIAN et al., 2016).

1.3.1.1. ENSAIO DO MTT

O ensaio de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*), descrito por Mosmann (1983) avalia a viabilidade celular por meio da redução do sal de tetrazolium (coloração amarelo) pelas células viáveis, a sal de formazan, originando cristais de cor violeta (insolúveis em água) (Figura 6). O MTT é capaz de atravessar a membrana de células viáveis, onde por meio da ação das enzimas redutases e desidrogenases presentes, respectivamente, na membrana interna mitocondrial e no retículo endoplasmático, é reduzido a cristal de formazan. Devido às membranas plasmáticas serem impermeáveis ao produto desta reação, os cristais de formazan se acumulam no citoplasma das células viáveis (van TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015). Esta reação irá ocorrer somente em células metabolicamente ativas, e a absorvância da solução resultante da dissolução desses cristais é diretamente proporcional à quantidade de MTT reduzido que, por sua vez, reflete a capacidade redutora das organelas envolvidas e, conseqüentemente, a viabilidade das células (FOTAKIS, TIMBRELL, 2006). Assim, devido à sua facilidade e funcionalidade, este ensaio é essencial para a determinação das concentrações e tempos de tratamento a

serem adotados em experimentos posteriores, como por exemplo os ensaios de genotoxicidade, avaliação de morte entre outros (GILBERT E FRIEDRICH, 2017).

Figura 6: Redução enzimática de MTT para formazan pela ação das enzimas redutases e desidrogenases.

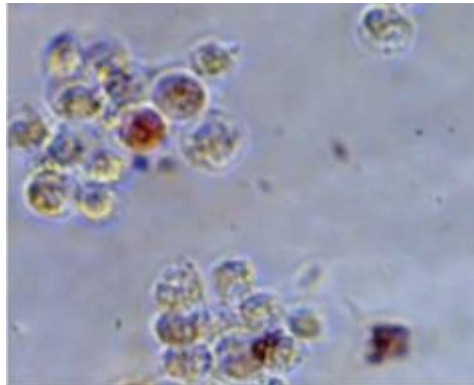


Fonte: adaptado de GILBERT E FRIEDRICH, 2017.

1.3.1.2 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO (VN)

O ensaio de captação do vermelho neutro ($C_{15}H_{17}ClN_4$) é baseado na capacidade de células viáveis incorporarem por difusão passiva o corante vermelho neutro, que se deposita nos lisossomos (Figura 7). Basicamente, a absorção de vermelho neutro depende da capacidade da célula de manter o gradiente de pH lisossomal, que tem atividade ácida em relação ao citoplasmático; este processo ocorre através do consumo de ATP (REPETTO; Del PESO; ZURITA, 2008). O vermelho neutro, sendo solúvel em água, concentra-se nos lisossomos, fixando-se por ligações hidrofóbicas na matriz lisossomal. O corante é extraído das células utilizando-se solução de etanol acidificada e sua absorbância é medida por espectrofotômetro. O ensaio VN permite avaliar a permeabilidade da membrana e a atividade lisossomal, sendo possível então, expressar a viabilidade por meio da concentração da captação de VN por células e lisossomos viáveis após a exposição ao composto teste. Portanto, o teste de captação do vermelho neutro fornece uma estimativa quantitativa do número de células viáveis *in vitro* (GILBERT; FRIEDRICH, 2017).

Figura 7: Morfologia da linhagem humanas de células de neuroblastoma e a presença de vesículas lisossomais com a presença do vermelho neutro (aumento de 1.600X).



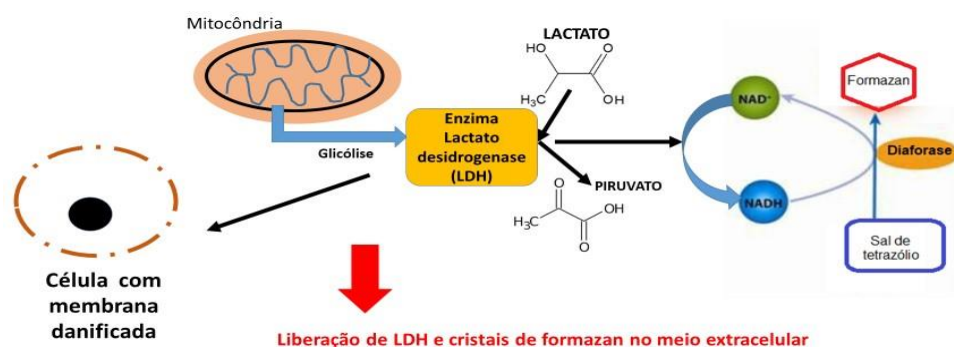
Fonte: adaptado de REPETTO et al., 2008.

1.3.1.3 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A enzima lactato desidrogenase (LDH) é responsável por catalisar a oxidação reversível do lactato para piruvato, tendo o NAD^+ como cofator durante a glicólise. A perda de LDH intracelular e sua liberação no meio extracelular é um indicador de morte celular irreversível devido a danos na membrana celular (STODDAR, 2011).

A LDH extracelular pode ser quantificada por uma reação enzimática na qual a LDH catalisa a conversão de lactato em piruvato via redução de NAD^+ para NADH (Figura 8). A diaforase utiliza então o NADH para reduzir o sal de tetrazólio a formazan (violeta) que pode ser medido a 490nm por espectrofotometria. O nível de formação de formazan é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada no meio, sendo assim, quanto maior a atividade enzimática, maior o grau de citotoxicidade (KORZENIEWSKI; CALLEWAERT, 1983; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Figura 8: Representação da liberação do LDH intracelular e da conversão que permite sua quantificação por espectrofotometria.



Fonte: modificado de THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2019.

1.4 ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INTRACELULARES (ERs)

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas continuamente durante o metabolismo aeróbico. Como exemplos das EROs produzidas temos radicais hidroxila, hidroperoxila, nitrito peróxido, óxido nítrico (ON), ânions superóxido; sendo a hidroxila altamente tóxica e gerada a partir do peróxido de hidrogênio (WU; YOTNDA, 2011). Dependendo do tipo de célula, as EROs podem ser altamente reativas e se acumularem no meio intracelular, levando a danos como oxidação de proteínas, lipídios e bases nitrogenadas, inativação de proteínas e lesões no DNA (HALLIWELL, 2014). Segundo Sies (2015), o estresse oxidativo intracelular corresponde ao desequilíbrio entre os níveis de EROs em uma célula e sua defesa antioxidante. Dependendo deste desequilíbrio e o tempo em que ocorre, o aumento da produção de EROs pode causar aumento ou interrupção da proliferação, senescência e morte celular.

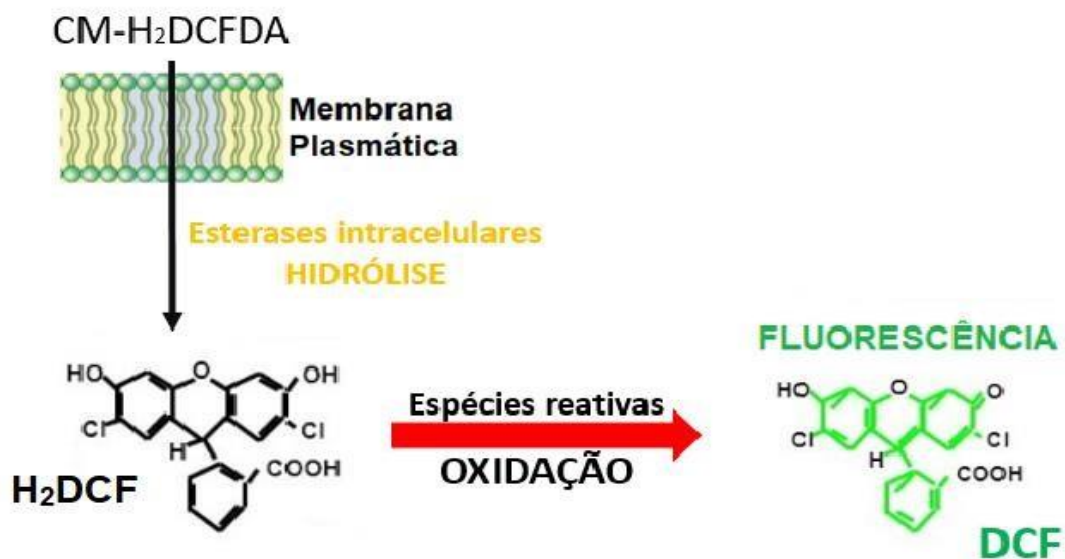
Modelos de cultura celular fornecem uma ferramenta valiosa para a compreensão dos mecanismos de estresse oxidativo intracelular produzidos por compostos em teste. Estudar os danos que podem ser causados por espécies reativas (ERs) no meio intracelular, bem como sua detoxificação, auxiliam na compreensão dos mecanismos que contribuem para os processos patológicos (SIES, 2015).

Para a avaliação da produção de espécies reativas (ERs) intracelulares bem como da atividade pró-oxidante ou antioxidante de compostos testes pode-se usar a sonda CMH₂DCFDA (5- (e-6) clorometil- 2', 7' diclorodidrofluoresceína diacetato acetil éster) oxidável. A sonda CM-H₂DCFDA não-fluorescente entra nas células por difusão passiva, onde seu grupo acetato é clivado por esterases intracelulares (Figura 9), enquanto o grupo tiol clorometil reage com a glutatona. O H₂DCF (2'-7'-diclorofluoresceína) e seus derivados são oxidados por uma ampla gama de ERs, como o peróxido de hidrogênio (principalmente), radicais hidroxila e hidroperoxi, o que poderá ser observado pela emissão de fluorescência verde por meio de leitura fluorimétrica (UY; MCGLASHAN; SHAIKH, 2011). Sendo assim, por meio da intensidade de fluorescência pode-se sugerir a ação pró-oxidante do composto teste; que pode levar a possíveis danos à molécula de DNA pela produção de ERs intracelulares (WOJTALA et al., 2014).

O cilostazol vem demonstrando sua eficiência em patologias, eficiência está diretamente correlacionada com a produção de ERs. Dentre elas pode-se citar a disfunção do endotélio vascular, que ocorre nas doenças cardiovasculares, onde os vasos envelhecidos apresentam um desbalanço de ERs gerando um quadro de estresse oxidativo, levando déficit de relaxamento deste tecido, aumento da vasoconstrição e inflamação. Estes fatores estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de aterosclerose e com casos de trombose (LAKATTA; LEVY, 2003).

Moreira et al. (2018) demonstraram em modelo *in vivo* que o tratamento com cilostazol diminuiu consideravelmente as EROs em relação aos animais-controles não tratados. Descreveram ainda inibidores de PDE3 exercerem efeitos positivos sobre a função endotelial de ratos idosos, levando ao aumento de vasodilatação, da acetilcolina e à diminuição da vasoconstrição mediada por noradrenalina. Como o estresse oxidativo tem um papel fundamental no desenvolvimento da lesão vascular induzida pelo envelhecimento, Moreira et al. (2018) sugeriram que o fármaco cilostazol possui efeito protetor, pois levou à redução de O^{\cdot}_2 , um dos principais agentes causadores do desbalanço de ERs. Diante dos relatos da literatura sobre as ações antioxidantes do cilostazol, ressalta-se a importância de estudos de quantificação de ERs intracelulares após tratamento com os compostos derivados deste fármaco.

Figura 9: Etapas da formação do composto fluorescente DCF a partir da hidrólise e oxidação da sonda CM-H₂DCFDA.



Fonte: modificado de CHIN et al., 2011.

1.5 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR - APOPTOSE E NECROSE

Modos distintos de morte celular são estudados há muito tempo. Os dois principais, apoptose e necrose, são essenciais para o desenvolvimento normal dos seres vivos e para a homeostase, mas também estão envolvidos na patogênese de certas doenças (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Danos celulares graves como a privação prolongada de energia levam à morte celular regulada. A apoptose representa um dos principais mecanismos de morte regulada;

ocorre não apenas após dano ou estresse celular, mas também durante o desenvolvimento normal e a morfogênese (YING; PADANILAM, 2016).

A morte celular por apoptose ocorre por uma série de características morfológicas e bioquímicas, tais como formação de vesículas formadas a partir da invaginação da membrana plasmática, condensação da cromatina, encolhimento de células e organelas, clivagem do DNA, formação de corpos apoptóticos e fagocitose (MOR; ALVERO, 2015). Pode ser desencadeada por estímulos extrínsecos através de receptores fisiológicos altamente específicos de sinalização de morte na superfície celular, como TNF α (do inglês, *tumor necrosis factor α*), FAS (do inglês, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*) e TRAIL (do inglês, *TNF-related apoptosis inducing ligand*) ou por estímulos intrínsecos viasinalizaçãomitocondrial(NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

A apoptose extrínseca é uma via de morte celular normalmente induzida por sinais de estresse extracelular que são detectados e propagados por receptores transmembrana específicos. Esta via é dependente de caspases e caracteriza-se pela presença de três formas de execução: sinalização do receptor de morte e ativação da caspase-8 (ou 10)/caspase-3; sinalização do receptor de morte e ativação da caspase-8/ tBID/MOMP/ caspase-9/caspase-3; sinalização de receptor de dependência induzida por privação de ligante seguida por ativação da cascata de caspase-9/ caspase-3 (GALLUZZI et al., 2012).

A forma mais descrita na literatura é a via intrínseca, na qual a mitocôndria induz a apoptose pela liberação do citocromo-c no citoplasma, iniciando um complexo multiproteico que tem como proteína efetora APAF1, ativando a caspase-9 e a formação dos "apoptossomas" (GREEN;KROEMER,2004). Esta via é ativada por inúmeros estímulos, incluindo privação de fatores de crescimento, oxidantes, sobrecarga de íons cálcio, ativação de proto-oncogenes, agentes e drogas direcionadas aos microtúbulos (HASSAN et al., 2014).

A necrose também pode funcionar como um modo alternativo programado de morte celular, normalmente não regulada, causada por indutores de estresse não específicos ou não fisiológicos, levando ao inchaço citoplasmático, ruptura e extravasamento do conteúdo celular (CHEN; KANG; FU, 2018). Este tipo de morte é independente de ATP e tem suas características morfológicas únicas, como volume aumentado da célula ou organela (oncoses), inchaço mitocondrial (principalmente), ruptura da membrana plasmática (vazamento celular) e consequente inflamação (YING, PADANILAM, 2016). A morte celular não regulada ("necrose primária") é a resposta ao estresse exógeno extremo, que provoca uma ruptura imediata da membrana celular e liberação de moléculas intracelulares.

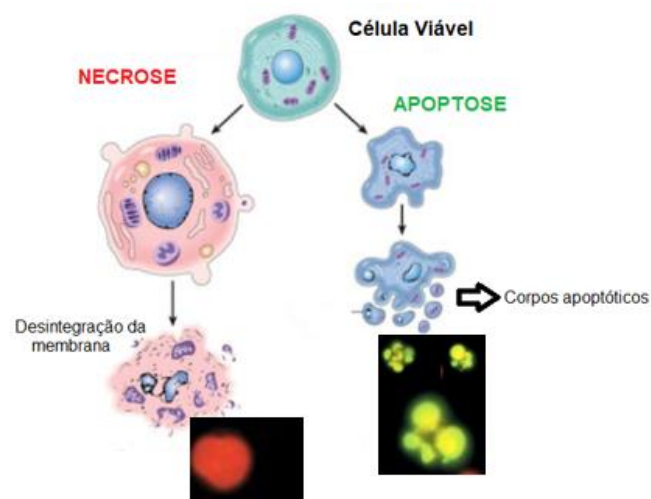
Após recentes pesquisas sobre morte celular, outras formas de necrose programadas foram relatadas, como necroptose, ferroptose e piroptose, sendo que a necrose não seria então representada como um tipo de morte celular meramente acidental (CHEN; KANG; FU, 2018). O termo 'necroptose' foi recentemente usado como sinônimo de

necrose regulada que pode ser induzida por dano ao DNA e envolve a ligação dos receptores de morte (GALLUZZI et al., 2012).

A identificação do tipo de morte que um composto pode estar induzindo é um indicativo valioso dos mecanismos que podem estar sendo estimulados ou inibidos durante este processo. Por exemplo, a avaliação da citotoxicidade; o número de células viáveis, necróticas e apoptóticas que resultam da avaliação de morte, pode validar os resultados obtidos nos testes colorimétricos. Diante dos relatos descritos na literatura sobre a ação do cilostazol nas vias de sinalização de morte e seu efeito antiapoptótico e protetor como citam Xie et al. (2018), ressalta-se a importância de estudos com os compostos derivados deste fármaco.

A diferenciação dos tipos de morte por técnicas de coloração fluorescente são ferramentas que auxiliam nas distinções morfológicas causadas por apoptose e necrose (Figura 10A). A técnica de McGahon (1995) baseia-se na coloração diferencial promovida pelos corantes laranja de acridina (LA) e brometo de etídio (BE) (Figura 10B). As células com membrana intacta são coradas em verde apenas com o corante LA e podem ser diferenciadas em viáveis e apoptóticas pela presença dos corpos apoptóticos. Já as células que sofreram o processo de morte por necrose, devido à desintegração das membranas, são coradas em vermelho pelo BE.

Figura 10: Características morfológicas e coloração diferencial de células apoptóticas e necróticas após uso de laranja de acridina e brometo de etídio.



Fonte: Adaptado de Grivicich; Regner; Rocha, 2007.

1.6 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE

1.6.1 ENSAIO DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPAN

Ensaio como o azul de tripan são indicados pelas agências reguladoras para serem aplicados previamente aos ensaios de genotoxicidade para avaliação da viabilidade celular da amostra. Seu resultado evita a avaliação de amostras que apresentem um grande número de células com danos consideráveis e, conseqüentemente, evita dados falso positivos e a super estimação da genotoxicidade de compostos testes (TICE, et al., 2000, KIRKLAND, 2011).

A integridade da membrana celular é um critério básico para distinguir células mortas de células vivas. O azul de tripan ($C_{34}H_{24}N_6Na_4 O_{14}S_4$), um corante vital, tem sido utilizado para corar tecidos vivos, pois possui capacidade de penetrar nas células não viáveis corando-as de azul, enquanto as células viáveis aparecem sem coloração ao microscópio (AVELARFREITAS et al., 2014). As células viáveis possuem membrana citoplasmática semipermeável intacta, sendo assim, seletivas, não absorvendo corante do meio circundante. Por outro lado, as células não viáveis normalmente possuem membrana desestruturada e não funcional e, portanto, absorvem o corante e são coradas (STROBER, 2015). O ensaio requer que as células avaliadas estejam em uma única suspensão e estas são então visualizadas e contadas ao microscópio usando um volume definido ou utilizando dispositivos de contagem automáticos. A partir dessa contagem relativamente simples, calcula-se o número total de células e a porcentagem de células viáveis (MALTA et al., 2006; STODDAR, 2011). Porém, este método não diferencia entre células apoptóticas e necróticas.

1.6.2 ENSAIO COMETA

A genotoxicidade é a propriedade que agentes químicos ou físicos possuem de interagir com o DNA, causar danos e afetar a integridade de uma célula. O ensaio cometa, também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única, é uma técnica sensível para a detecção de quebras de fitas de DNA (simples e duplas) e sítios álcali- lábeis em células eucarióticas, causados por agentes potencialmente genotóxicos por meio da separação de fragmentos de DNA através de eletroforese em lâmina (MARONPOT; HOBBS; HAYASHI, 2018). Este ensaio é um método rápido, sensível, barato e confiável, que permite determinar a extensão do dano causado ao DNA. Junto com o ensaio de micronúcleo que detecta mutagenicidade, é utilizado para avaliação de danos genotóxicos *in vitro* e *in vivo* e é recomendado pela OECD para validação de dados *in vivo* (COLLINS et al., 2008; PARRY; PARRY, 2012).

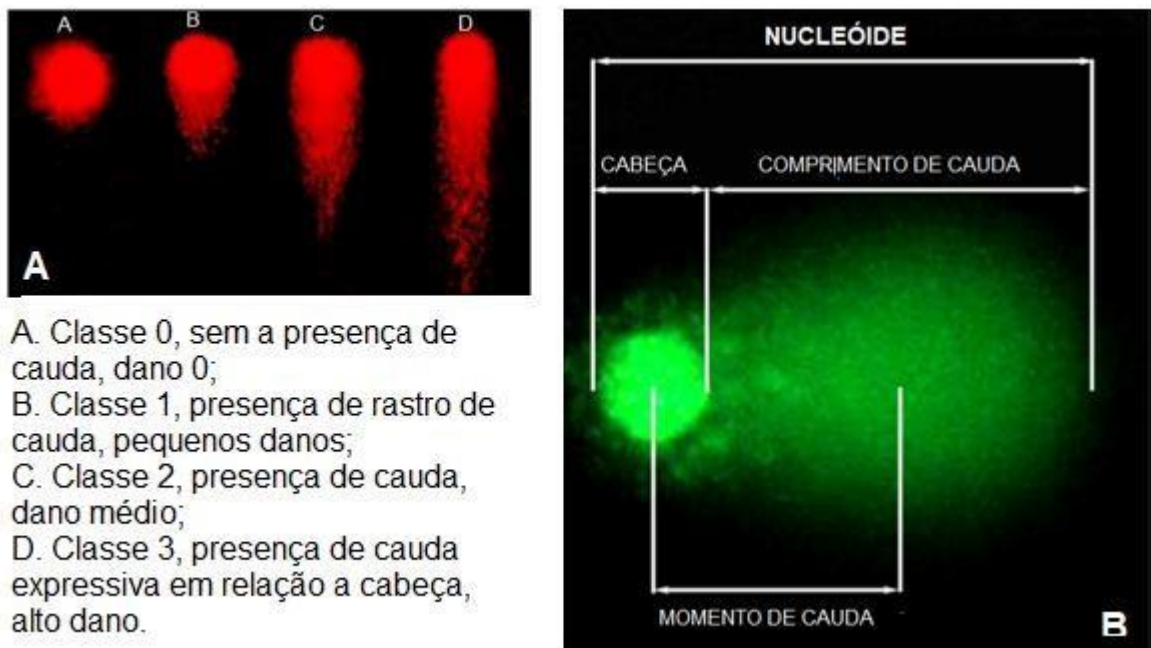
Nas células viáveis, quando o DNA não está danificado, apresenta-se na sua forma original, altamente condensado. Para que se possa avaliar os possíveis danos causados ao DNA é necessário que ocorra a lise das membranas celulares. Esta é feita com detergente biológico. Após a lise, o DNA permanece como uma estrutura nuclear, denominada nucleóide. As histonas são dissociadas do DNA com uma alta concentração de NaCl. Com a exposição dos nucleóides e o relaxamento das ligações, a exposição do dano no DNA pode ocorrer sob condições “neutras” ou alcalinas durante a imersão em solução tampão de corrida eletroforética (COLLINS, 2015).

O protocolo proposto por Singh et al. (1988) propõe soluções neutras para lise e eletroforese alcalina, permitindo principalmente a detecção de quebras de DNA de cadeia dupla, mas também quebras de DNA de fita simples, sítio álcali- lábeis, ligações entre DNA-proteína e quebras de fita simples de DNA associadas a locais de reparo por excisão incompleta (LU; LIU; YANG, 2017). Nesse protocolo há a incorporação de células embebidas em agarose de baixo ponto de fusão em uma lâmina de vidro pré-revestida com agarose de ponto de fusão normal; sendo assim, as células encontram-se em um meio que servirá como substrato para migração durante a eletroforese. Durante o processo de corrida eletroforética a corrente elétrica aplicada na solução alcalina faz com que as quebras na molécula do DNA mais leves migrem na malha de agarose, sendo o DNA danificado atraído para o ânodo, formando uma "cauda de cometa". Já os nucleóides que não apresentam danos e apresentam uma maior força de ligação entre as moléculas de cromatina continuam compactados e a sua migração torna-se mais difícil na malha do substrato (COLLINS, 2004).

Os tempos de tratamento das células durante o ensaio do cometa *in vitro* sugeridos por KOPPEN et al. (2017) são de 3 a 6 horas, o que permite a observação de danos anteriores a um possível reparo de DNA celular.

Após a eletroforese os nucleóides são corados com corante fluorescente e são analisados para se determinar a extensão do dano causado pelo agente avaliado. A análise microscópica pode ser manual ou automática; esta última por meio softwares específicos de imagem (Figura 11 A). Os softwares produzem dados a partir da mensuração dos cometas como a intensidade total de cada cometa, comprimento de cauda, a porcentagem de DNA na cabeça e na cauda e o momento da cauda. O comprimento da cauda do cometa é o tamanho do rastro produzido durante a eletroforese, já o momento da cauda (*tail moment*) é o produto do tamanho da cauda calculada (*tail length*) pela porcentagem do DNA espalhado (*tail DNA%*) (Figura 11B) (COLLINS, 2004, COLLINS et al., 2008).

Figura 11: Ensaio Cometa (A): tipos observados de acordo com a extensão do dano no DNA. (B): parâmetros utilizados na análise das imagens por software.



Fonte: adaptado de CELL BIOLABS Inc. All Rights Reserved. Website by Best Rank, 2018.

1.7 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO E MIGRAÇÃO - “WOUND-HEALING”

O ensaio de cicatrização e migração, “wound-healing”, caracteriza-se por ser um teste *in vitro* para avaliar a taxa migratória celular em uma área isenta de células, criada numa monocamada confluyente por exclusão física ou por remoção das células da área, por meio de danos mecânicos, térmicos ou químicos (JONKMAN et al., 2014). A migração interna que fecha a cicatriz produzida *in vitro* imita o fechamento de uma ferida, podendo inferir dados como taxa de fechamento, que é medida pela velocidade do movimento coletivo das células (Figura 12) (FRIEDL; GILMOUR, 2009; VEDULA, et al., 2013).

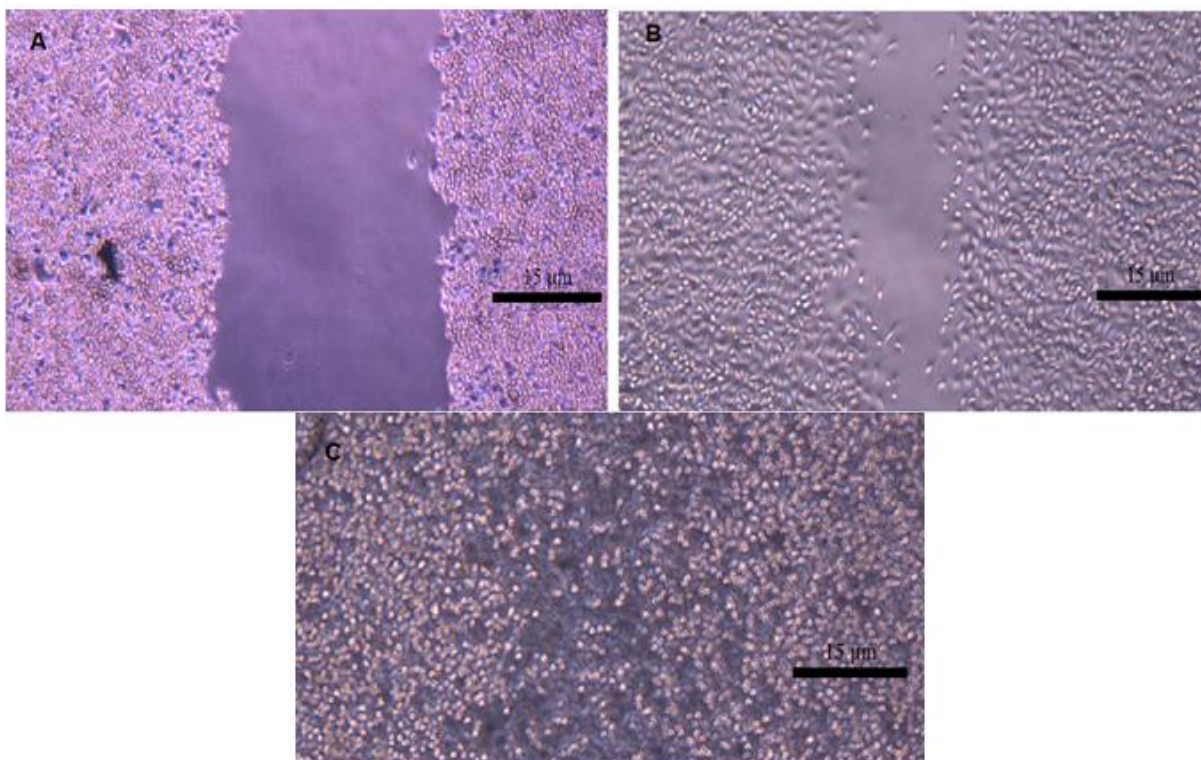
Embora não seja uma duplicação exata da migração celular *in vivo*, imitando a migração de células na cicatrização de feridas, estudos de migração celular direcional podem prever o comportamento e a interação celular (RODRIGUEZ; WU; GUAN, 2005). Algumas células funcionais como os fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais podem migrar em uma direção específica apresentando uma simetria (ou seja, igual probabilidade de migrar em todas as direções, apresentando uma distribuição igualitária dentro da monocamada de células) (FLEMING; FRAME; HOUSLAY, 2004; NETHERTON; MAURICE, 2005; LYLE et al., 2008).

Alguns tipos celulares migram apenas em um substrato definido, como as células epiteliais, que se movem ao longo de uma membrana basal, mas não através de tecidos

intersticiais, enquanto outros tipos de células, incluindo leucócitos, são versáteis, pois interagem e migram dentro de praticamente qualquer substrato presente no corpo. A migração celular coletiva é essencial na construção, modelagem e remodelação de tecidos complexos e compartimentos de tecidos, como epitélios, ductos, glândulas e vasos, mas também contribui para a progressão do câncer (FRIEDL; WOLF, 2010; VEDULA, et al., 2013).

O estudo da cicatrização da área livre de células por meio da análise morfológica em tempos regulares do movimento celular coletivo é, portanto, relevante para muitos processos de morfogênese, reparo tecidual, invasão e metástase em câncer (ILINA; FRIEDL, 2009). Sabendo-se que (i) células tumorais como HUH7 (Figura 12) têm capacidade migratória (QIN, et al. 2017); (ii) o cilostazol pode agir como um inibidor plaquetário, com efeito eficaz neo-adjuvante no bloqueio da atividade metastática; (iii) o cAMP está envolvido na inibição da motilidade de vários tipos celulares; torna-se relevante o estudo da ação dos compostos derivados do cilostazol no processo de migração *in vitro*, pois isto possibilitará que sejam avaliados posteriormente como fármacos quimioterápicos (DONG et al., 2015; CHOI, et al., 2018).

Figura 12: Ensaio de cicatrização e migração – “Wound – healing”, com células de hepatocarcinoma humano – HUH7, com tratamento PBS (pH 7,0), período de 0 (A), 12(B) e 24(C) horas. Aumento de 20x.



Fonte: A autora, 2019.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade, a atividade anti-metastática, anti- migratória e genotóxica dos compostos sintetizados LQFM20 e LQFM23 em linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HuH7) *in vitro*, contribuindo para suas indicações como possíveis quimioterápicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as células de hepatocarcinoma humano (HuH7) *in vitro* após tratamentos com diferentes concentrações dos compostos LQFM20 e LQFM23 quanto à (ao):

- viabilidade celular,
- quantificação das espécies reativas intracelulares,
- perfil de migração celular,
- indução de morte celular,
- genotoxicidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

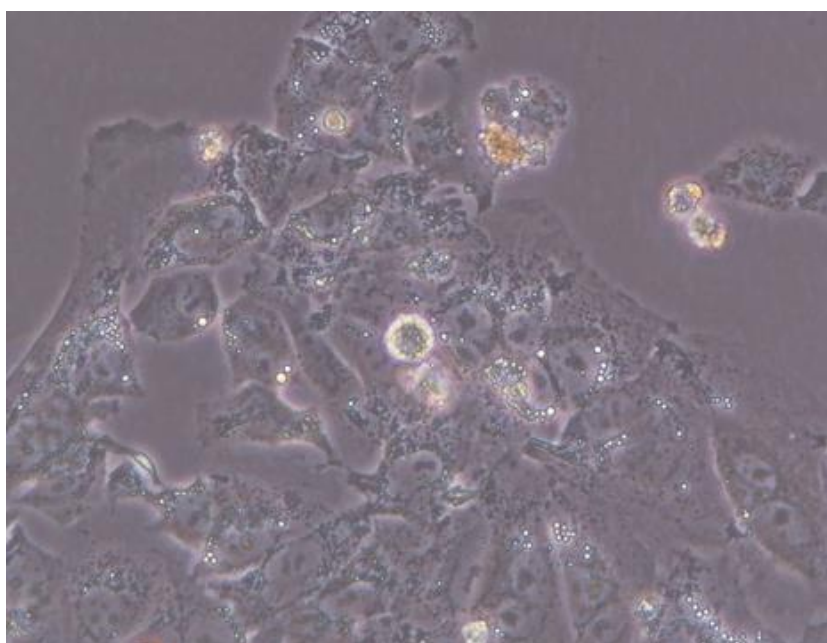
3.1 LINHAGEM TUMORAL DE FÍGADO - HUH7 E CONDIÇÕES DE CULTIVO

HuH7 é uma linhagem epitelial de carcinoma derivada de hepatócitos (Figura 13), proveniente de homem japonês de 57 anos de idade, em 1982. Esta linhagem foi estabelecida por Nakabayshi, H. e Sato, J, da *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank – JCRB Cell Bank* (JCRB0403HuH-7) e foi gentilmente cedida ao Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (UEL-PR) pelo Dr. Juliano Bordignon do Instituto Carlos Chagas, FioCruz- PR.

A linhagem, HUH7 é composta por células imortalizadas, do tipo aderentes à superfície de frascos ou placas e crescem tipicamente como monocamadas 2D. Embora contenham muitas sendo digno de nota que as células HuH7 têm uma mutação de ponto no gene *TP53*, que leva à produção de proteínas de reparo do DNA mutantes não funcionais (KASAI, 2018).

A linhagem HuH7 foi cultivada em frascos de cultura com capacidade de 60 mL e área de crescimento de 25 cm², em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, CAS: 12657-029, Gibco), penicilina 0,06 g/L (CAS: 113-98-4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), estreptomicina 0,10 g/L (CAS: 3810-74-0, Sigma-Aldrich). Os cultivos foram mantidos em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa.

Figura 13: Células da linhagem HuH7 – aumento de 20x.



Fonte: OZAWA, 2014.

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRATAMENTO LQFM20 E LQFM23

Os compostos LQFM20 e LQFM23 foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Química Farmacêutica (UFG-BR) e Prof. Dr^a Cássia Regina Primila Cardoso (UFMT- BR). Os compostos foram diluídos em solução de PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4) com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO P.A., A.C.S. – Labsynth Ltda, São Paulo, BR), produzindo soluções estoque de 10mM para ambos os compostos, armazenados a -20°C. A partir das soluções estoque foram realizadas diluições para serem utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, quantificação de espécies reativas, morte celular, migração e genotoxicidade.

As concentrações escolhidas foram baseadas nos relatos de Shor (2002) após ensaios de citotoxicidade com cilostazol e Pazini (2012) que realizou ensaios de citotoxicidade com LQFM20 *in vitro* e *in vivo*.

3.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

3.3.1 PREPARO DE PLACAS

Para todos ensaios de citotoxicidade, MTT, VN, LDH e quantificação de ERs (em placas escuras) foram semeadas 1×10^4 células por poço em placas de cultura de 96 poços as quais foram estabilizadas durante 24 horas com meio de cultura completo. Para os tratamentos, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados duas vezes com PBS e em seguida as células foram tratadas com os compostos-testes, nas concentrações seriadas, em meio de cultura sem soro bovino fetal, por 24h.

3.3.2 MTT

Para a avaliação da citotoxicidade por meio do ensaio do MTT (MOSMANN,1983; SPECIAN et al., 2016), foram efetuados os passos descritos no item 3.3.1 utilizando-se as concentrações seriadas de 5 a 45 μ M para o composto LQFM20 e 10 a 40 μ M para LQFM23, diluídos em meio de cultura sem soro bovino fetal. O mesmo foi realizado com os respectivos controles de solvente (DMSO - 0,1%) e controle negativo (PBS pH7,4).

Após os tratamentos serem removidos foram adicionados a cada poço 100 μ L de solução de 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, CAS: 5736069-7, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,5mg/mL) dissolvido em meio de cultura completo e então realizada uma incubação por 4 h em estufa de CO₂, à 37°C. Finalmente o meio contendo a solução de MTT foi removido e foram adicionados 200 μ L de DMSO em cada poço. A absorbância foi mensurada usando espectrofotômetro (Biotek Elx800 – Winooski, EUA) com comprimento de onda de 570nm. A porcentagem (%) de viabilidade

celular foi obtida pela relação entre as absorvâncias dos poços de cada tratamento e as absorvâncias dos poços do controle negativo, que foi considerado como 100% de viabilidade celular.

3.3.3 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO - VN

Para avaliação da citotoxicidade por meio do ensaio de captação de VN, foi usado o protocolo descrito por Repetto, Del Peso e Zurita (2008), seguindo os passos descritos no item 3.3.1, com as concentrações seriadas de 5 a 45 μ M para ambos os compostos; o mesmo foi realizado com os respectivos controles de solvente (DMSO - 0,1%) e controle negativo (PBS pH7,4) Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 100 μ L da solução de VN (CAS: 553-24-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (40 μ g/mL) a cada poço e a placa incubada durante 3 h. Posteriormente, o meio contendo a solução de VN foi retirado, as células lavadas com PBS e 150 μ L da solução alcoólica de extração [50mL:49mL:1mL v/v/v (etanol 96%: água destilada: ácido acético glacial)] adicionado a cada poço. Por fim, a placa foi rapidamente homogeneizada até o VN ser extraído e formar uma solução homogênea, que foi analisada por espectrofotômetro (Biotek Elx800 – Winooski, EUA) em comprimento de onda de 540nm para obtenção da absorvância. Todos os experimentos foram realizados em replicatas de 8 poços para cada tratamento. A porcentagem (%) de viabilidade celular foi obtida pela relação entre as absorvâncias dos poços de cada tratamento e as absorvâncias dos poços do controle negativo, que foi considerado como 100% de viabilidade celular.

3.3.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE - LDH

Para medir quantitativamente a lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio a partir de células danificadas como um biomarcador para citotoxicidade celular e citólise, foi utilizado o kit colorimétrico, *Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit* (Thermo Scientific™, EUA). As placas foram tratadas por 24 h com concentrações de cada um dos compostos estudados (10 - 45 μ M) e os respectivos controles de solvente (DMSO - 0,1%), controle negativo (PBS pH7,4) e controle positivo (tampão de lise - *Thermo Scientific - Pierce®*). Após 23h e 15min de tratamento foram adicionados 10 μ L de tampão de lise nos poços reservados como controle positivo. Em seguida a placa foi incubada por 45 minutos a 37°C em estufa a 5% de CO₂. Em seguida à incubação, foram retirados 50 μ L do meio sobrenadante de cada poço e transferidos para outra placa; foram adicionados 50 μ L do mix de reação e feita a homogeneização de cada poço, incubando-se por 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente adicionados 50 μ L da solução de parada e homogeneizado novamente, evitando-se a formação de bolhas. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a

490nm (cristal de formazan) e 680nm (resíduo de fundo) (Biotek Elx800 – Winooski, EUA). Portanto, dos resultados obtidos para determinação da atividade de LDH, subtraiu-se do valor de absorvância de 680nm, aquele obtido com 490nm. O valor final representa a quantidade da enzima LDH liberada, ou seja, a absorvância real de LDH.

3.4 ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (ERs)

Para a determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas utilizou-se a sonda CM-H₂DCFDA (General Oxidative Stress Indicator - Invitrogen®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para verificar o potencial de oxi-redução dos dois compostos, as células foram tratadas nos tempos de 1, 3, 12 e 24 h com as concentrações de 15, 30 e 45µM do composto LQFM20 e 10, 20 e 40µM do composto LQFM23, escolhidas a partir dos resultados dos ensaios prévios de viabilidade celular. Em seguida aos tratamentos foram adicionados 5µM (100µL por poço) de CM-H₂DCFDA, deixando-se as placas por 30 minutos em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Para o controle positivo foi adicionado peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 2µM) por 20 minutos em cada poço. Após este intervalo foram realizadas duas lavagens com PBS, adicionados 100µL de PBS por poço para leitura, que foi realizada em leitor de placas com fluorescência Victor (PerkinElmer®, Waltham, USA), na faixa de excitação de 492 – 495 e de emissão de 517 – 527nm. Os resultados obtidos foram apresentados em unidades arbitrárias referentes a intensidade de fluorescência emitida pela reação entre a sonda e as ERs.

3.5 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR

A capacidade de indução de morte celular pelos compostos estudados na linhagem HuH7, bem como um possível potencial de proteção contra os eventos analisados, deu-se através da técnica descrita por McGahon et al. (1995). Esta técnica baseia-se em uma coloração diferencial das células com os corantes fluorescentes laranja de acridina (LA - (CAS: 494-38-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e brometo de etídeo (BE – CAS: 123945-8, Sigma-Aldrich), que possuem a capacidade de distinguir células normais, células em apoptose e células necróticas. Foram semeadas $0,1 \times 10^6$ células por poço em placas de 24 poços e posteriormente tratadas por 24 h com os compostos sintetizados na concentração 45µM para LQFM20 e 40µM para LQFM23. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e com controles negativo (PBS) e positivo (Doxorrubicina - 3 µg/mL, Adriamycin—CAS: 23214-92-8, Sigma-Aldrich), conforme Specian et al. (2016). Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas (trypsin 0.05 % - CAS: 25300-054 - Gibco) e 25µL da suspensão celular foram misturados a 10µL da solução de coloração (100µg/mL de LA e 100µg/mL de BE). Após homogeneização, a mistura de suspensão celular com a

adição de corante, foram colocadas sobre lâminas limpas, cobertas com lamínulas e analisadas 600 células por tratamento (200 por replicata), em microscópio de fluorescência Nikon (Melville, EUA- com filtro de excitação de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm), foi realizada a diferenciação dos 3 tipos de morte celular. Os resultados obtidos foram apresentados pela média de cada tipo de morte das 3 replicatas técnicas e seu respectivo desvio padrão.

3.7 ENSAIO COMETA - SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS

O ensaio utilizado seguiu protocolo descrito por Tice et al. (2000). Foram semeadas 1×10^5 células em placa de 24 poços, que permaneceram em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 h em meio de cultura completo para que estabilizassem. Em seguida as culturas foram tratadas por 4 h em meio de cultura livre de SBF, com diferentes concentrações de cada composto (LQFM20 – 18,8µM, 37,5µM, 75µM e 112,5µM e LQFM23 - 10µM, 20µM e 40µM) que foram selecionadas a partir dos ensaios de citotoxicidade anteriores e das IC₅₀ estimadas. As células foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 174 xg. Após a centrifugação, uma alíquota de 20µL da suspensão celular foi homogeneizada com 120µL de agarose LMP “*low melting point*” 0,5% e aplicada em lâminas pré-preparadas com uma camada de agarose NMP (do inglês, *normal melting point*) 1,5% de ponto de fusão normal.

Em seguida, foi determinada a viabilidade celular das culturas pela técnica de exclusão por azul de tripan, utilizando-se o equipamento de contagem de células Countess® Automated Cell Counter (Life Technologies - Carlsbad, EUA).

As lâminas foram submetidas à solução de lise (2,5M NaCl; 100mM ácido etileno diamino tetra acético (EDTA); 10mM Tris; 10% DMSO; 1% Triton X-100, pH 10) por 1 hora e meia a 4°C. Em seguida, foram incubadas por 20 minutos em tampão de eletroforese (0,3M NaCl; 1mM EDTA, pH13) a 4°C para a desnaturação e então submetidas à eletroforese alcalina (0,25V; 300mA; por 20 minutos).

Após a corrida, as lâminas foram submetidas à solução de neutralização (Tris 0,4M; pH7,5; 15min) e fixadas em álcool etílico absoluto 99,9% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 5 minutos. As lâminas foram mantidas a 4°C, e antes da análise, coradas individualmente com 40µL de GelRed™ (Biotium - Fremont, EUA), [1:10.000 v/v (Gel Red: PBS)] e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Melville, EUA), com filtro de excitação de 450-490nm e filtro de emissão (barreira) de 515nm, em objetiva de 40x.

A análise das lâminas foi realizada por meio do software Comet Imager versão 2.2 © (MetaSystems, Newton, EUA. Para cada imagem captada foram considerados a análise dos parâmetros *Tail Intensity* (referente à porcentagem de DNA na cauda) e *Tail Moment* (que considera a migração do material genético, bem como a quantidade relativa de DNA na cauda). Foram analisadas o total de 100 células por replicata técnica.

3.8 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO E MIGRAÇÃO - "WOUND-HEALING"

A técnica utilizada foi baseada em Rodriguez; Wu; Guan (2005). Foram semeadas 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços e mantidas para estabilização durante 24 h em estufa até máxima confluência. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e posteriormente criada uma lesão na monocamada de células por meio de raspagem manual com uma ponteira de 200 μ L. Em seguida as placas foram lavadas 2 vezes com PBS de forma delicada para retirada das células não aderentes produzidas pela lesão. Posteriormente foi adicionado 1mL de meio com soro contendo as três concentrações de cada um dos compostos 15, 30 e 45 μ M para o composto LQFM20 e 10, 20 e 40 μ M para o composto LQFM23, o controle negativo (PBS pH7,4) e controle positivo (doxorrubicina - 3 μ g/mL).

O processo de migração celular foi avaliado em dois campos distintos e as imagens fotografadas nos tempos de 0, 12 e 24 horas no total de 3 replicatas técnica por tratamento, e em seguida analisadas pelo software TScratch (Instituto Tecnológico de Massachussets, Califórnia, EUA), que quantifica a área em que houve a migração nos diferentes tempos e o percentual de redução da lesão.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais obtidos foram analisados com o software GraphPad Prism® Versão 6, (La Jolla – EUA). Considerou-se o valor de $p < 0,05$ e intervalo de confiança (IC) de 95% para todos os parâmetros avaliados.

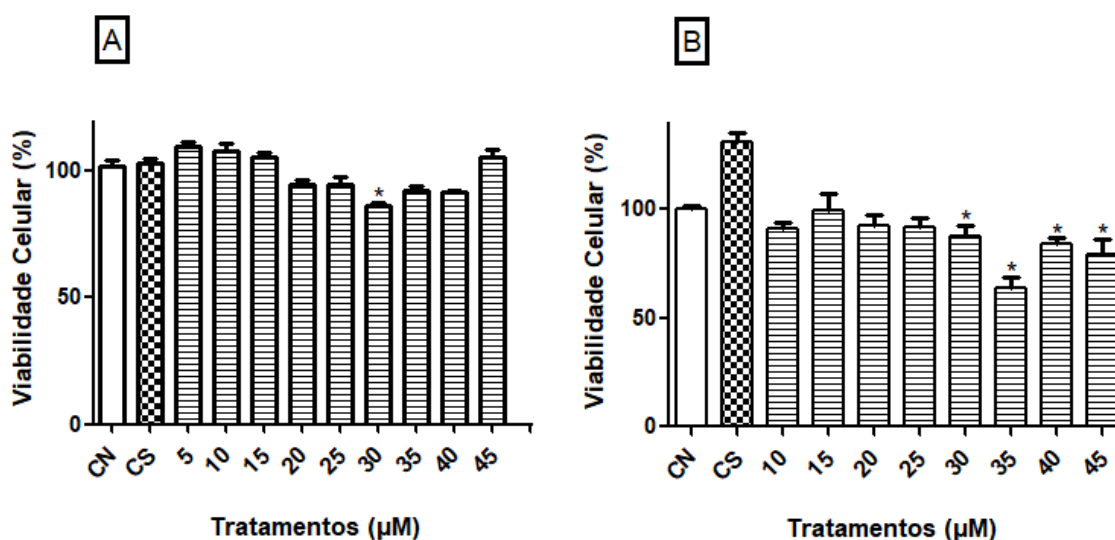
Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e os dados com distribuição homogênea foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de pós teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de comparação múltipla de Dunn.

4. RESULTADOS

4.1 MTT

O composto LQFM20 apresentou citotoxicidade, diminuindo 14,5% da viabilidade celular na concentração de 30 μ M, conforme demonstrado na Figura 14A e Tabela 1.1 do Apêndice 1. Já o composto LQFM23 apresentou citotoxicidade em concentrações iguais ou superiores a 30 μ M, sendo que 35 μ M diminuiu 35,85% da atividade metabólica celular, conforme Figura 14B e Tabela 1.2 do Apêndice 1. Nenhum dos compostos foi capaz de diminuir o crescimento em 50% da população celular; seus valores de IC₅₀ foram estimados para os dois compostos foi de 112,7 μ M para LQFM20 e 93,4 μ M para LQFM23.

Figura 14: Viabilidade de células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20 (A) e LQFM23 (B) por meio do ensaio de MTT.



CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura.

* Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$);

Teste de Kruskal-Wallis, pós- teste de comparação múltipla de Dunn (aplicado A);

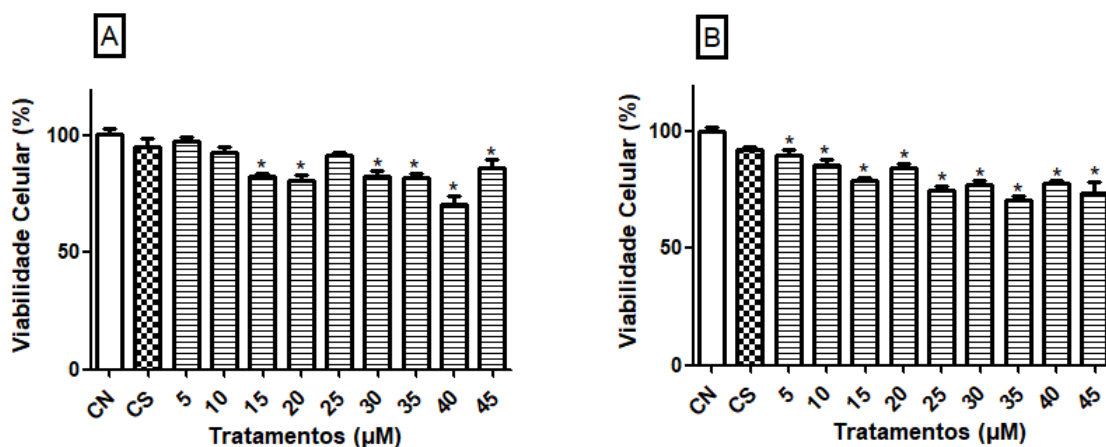
ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey (aplicado B).

Fonte: A autora, 2018.

4.2 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO

Ambos os compostos não foram capazes de diminuir 50% do metabolismo lisossomal. Porém, LQFM20 reduziu a viabilidade celular a partir de 15 μ M sendo que a concentração 40 μ M redução foi de 29,48% do crescimento celular. LQFM23 apresentou citotoxicidade a partir de 5 μ M sendo que a concentração de 35 μ M inibiu 30,62% do metabolismo celular lisossomal. Os dados obtidos neste ensaio estão demonstrados na Figura 15A e B e Tabelas 1.3 e 1.4 do Apêndice 1.

Figura 15: Viabilidade de células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20 (A) e LQFM23 (B) por meio do ensaio de vermelho neutro.



CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura.

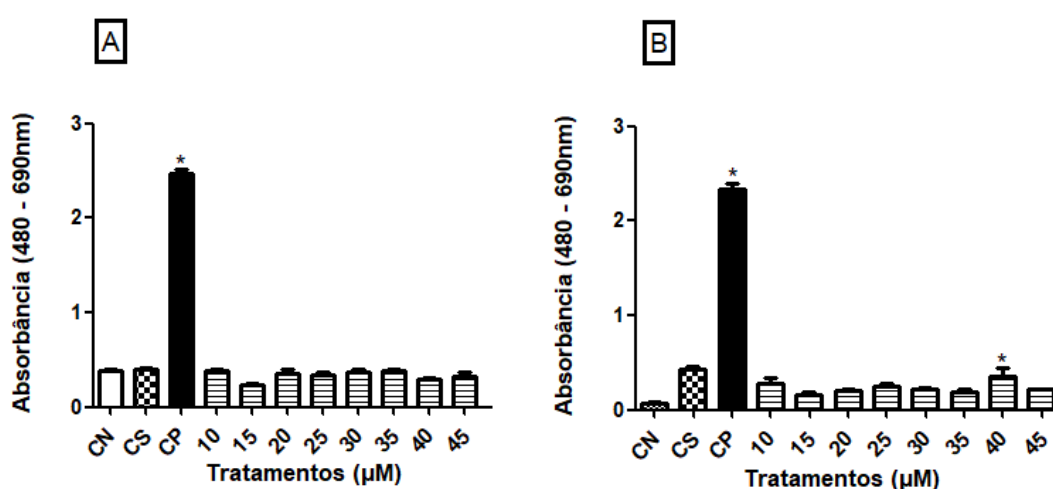
*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

4.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA- LDH

Na análise da liberação da enzima lactato desidrogenase apenas o composto LQFM23 na concentração de 40 μ M apresentou aumento significativo quando comparado ao controle negativo conforme demonstrado na Figura 16A e B e Tabelas 1.5 e 1.6 do Apêndice 1.

Figura 16: Avaliação da atividade da enzima lactato desidrogenase em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20(A) e LQFM23 (B).



CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo, tampão de lise Thermo Scientific – Pierce.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

4.4 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR

Os dados obtidos no ensaio por meio da coloração diferencial das células HuH7 tratadas por 24h com os compostos LQFM20 (45 μ M) e LQFM23(40 μ M), não foram estatisticamente diferentes dos controles utilizados para os dois tipos de morte analisados, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Número de células HuH7 viáveis, apoptóticas e necróticas, observadas no ensaio de Apoptose/Necrose, após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20 e LQFM23

| TRATAMENTO | Células HuH7 | | |
|----------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| | VIÁVEIS | APOPTÓTICAS | NECRÓTICAS |
| CN | 174,6 ± 6,8 | 15,4 ± 7,3 | 10 ± 4,6 |
| CP | 138,3 ± 15,9* | 38 ± 15,0* | 23,6 ± 6,6* |
| LQFM20 45 μ M | 171,3 ± 10,0 | 20,6 ± 11,2 | 8 ± 1,73 |
| LQFM23 40 μ M | 166 ± 2,6 | 24,6 ± 4,0 | 9,33 ± 2,3 |

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino).

CP: controle positivo (Doxorrubicina, 3 μ g/mL).

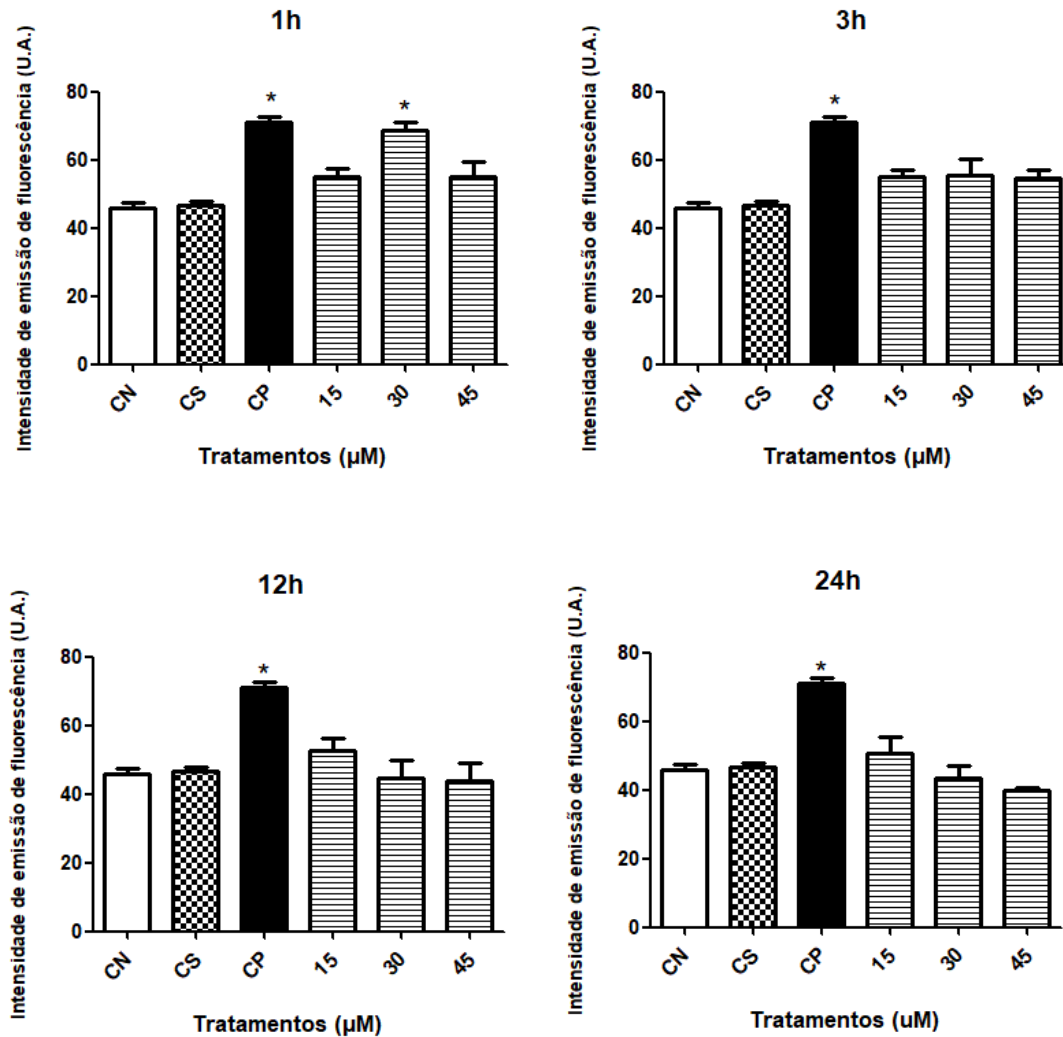
*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

4.5 ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (ERs) INTRACELULARES

Os resultados do ensaio de quantificação de ERs indicaram que após os tratamentos de 1, 3, 12 e 24 h com os compostos LQFM20 e LQFM23 não houve alteração do estado redox das células HuH7 em nenhuma das concentrações avaliadas com exceção das células tratadas por 1h com o composto LQFM20 (30 μ M), conforme demonstrado nas Figuras 17 e 18.

Figura 17: Quantificação de ERs intracelular em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento de 1, 3, 12 e 24 horas com o composto LQFM20.

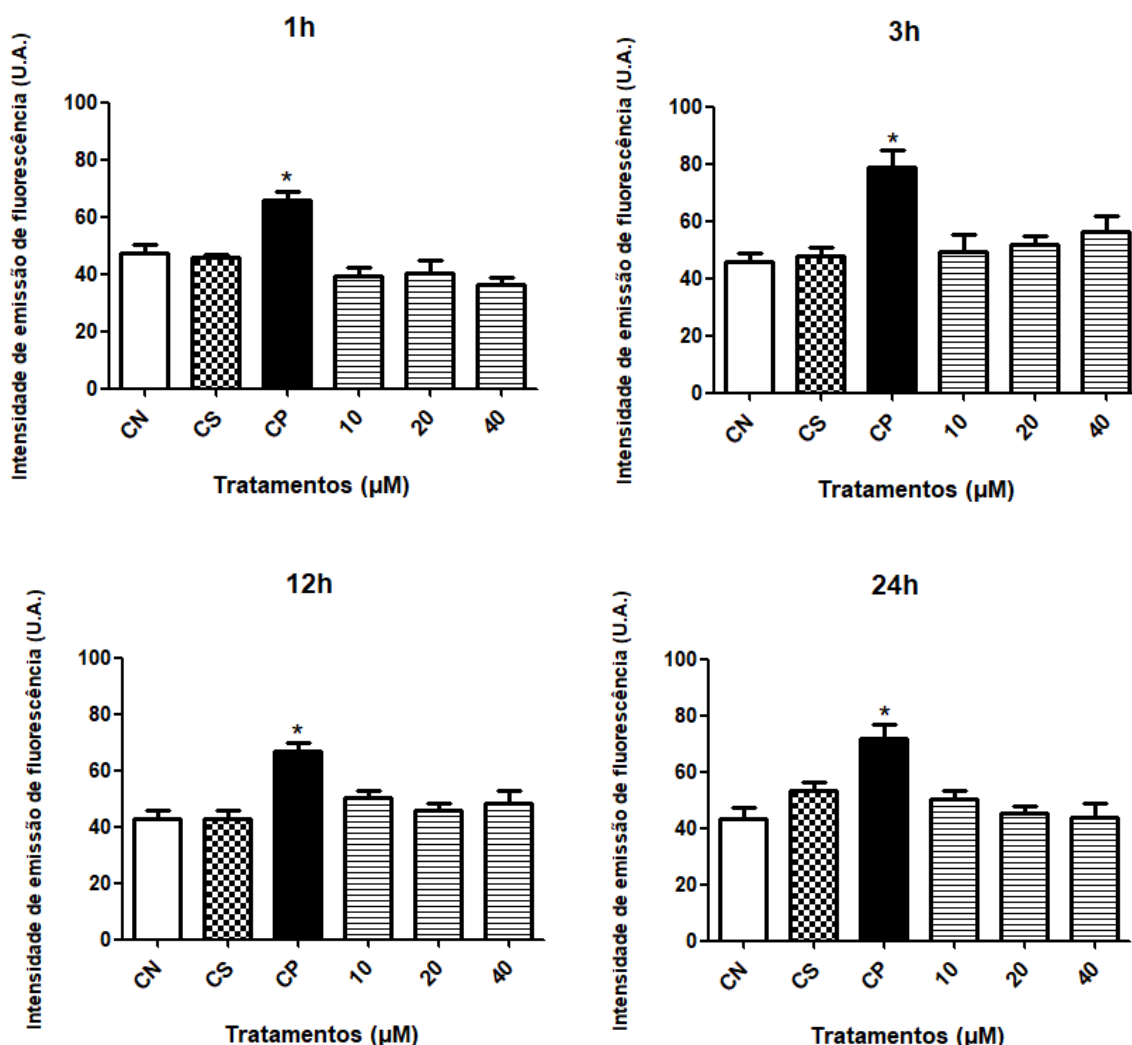


CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo (peróxido de hidrogênio 30% concentração de 2μM).

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 18: Quantificação de ERs intracelular em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento de 1, 3, 12 e 24 horas com o composto LQFM23.



CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo (peróxido de hidrogênio 30% concentração de 2μM).

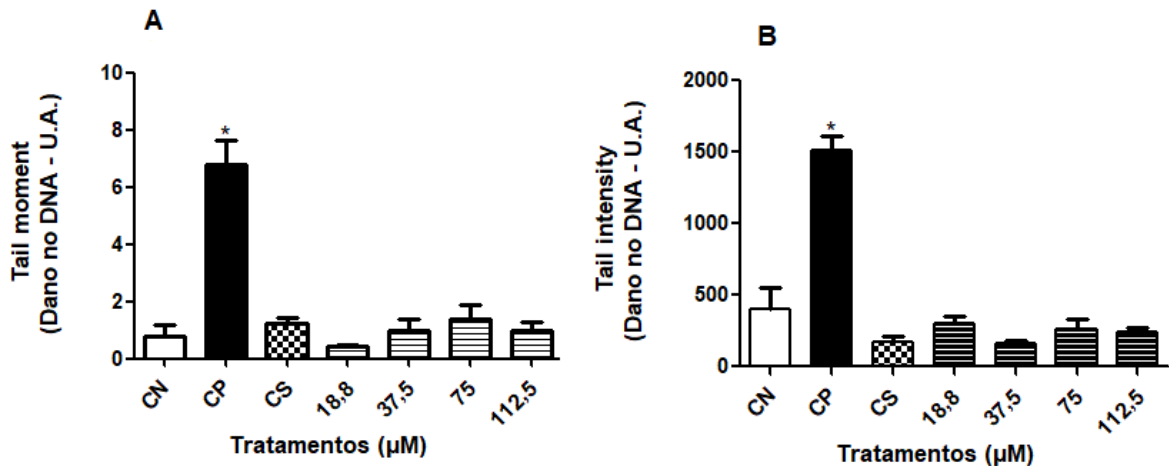
*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós-teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

4.6 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE – COMETA

Todas as culturas que apresentaram viabilidade celular superior a 80% quando submetidas ao ensaio cometa. A análise do ensaio do cometa nos sugere que nenhum dos compostos apresentou atividade genotóxica significativa em nenhuma das concentrações avaliadas, conforme a Figura 18. Doxorrubicina (3μg/mL) aumentou significativamente a porcentagem de dano no DNA das células HuH7 após tratamento por 4 horas (Figuras 19 e 20).

Figura 19: Avaliação da genotoxicidade (parâmetros *Tail moment* (A), *Tail intensity* (B)) em células humanas de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento por 4 h com os compostos LQFM20.



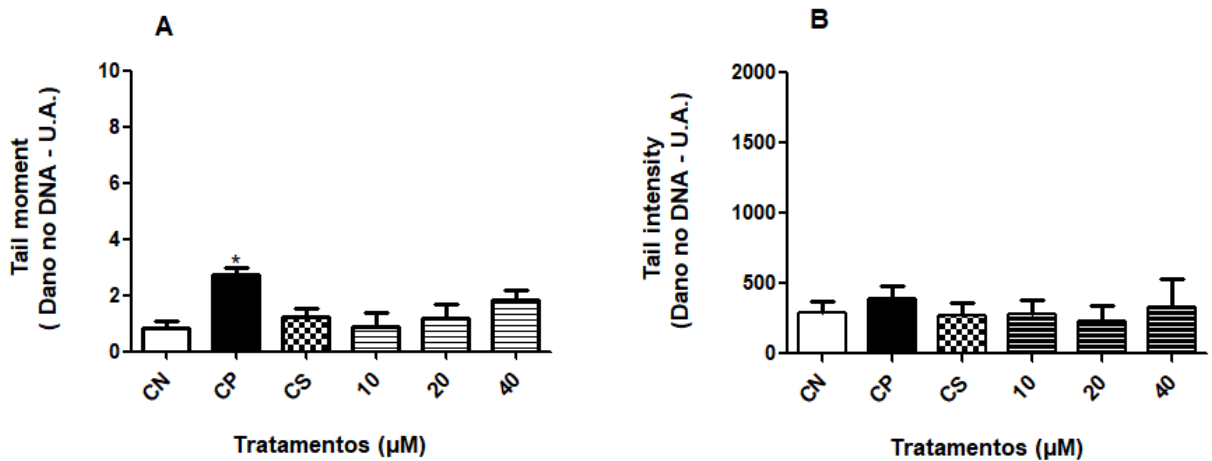
U.A.: unidades arbitrária.

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo, Doxorrubicina 3μg/ mL.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 20: Avaliação da genotoxicidade (parâmetros *Tail moment* (A), *Tail intensity* (B)) em células humanas de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento por 4 h com os compostos LQFM23.



U.A.: unidades arbitrária.

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo, Doxorrubicina 3μg/ mL.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

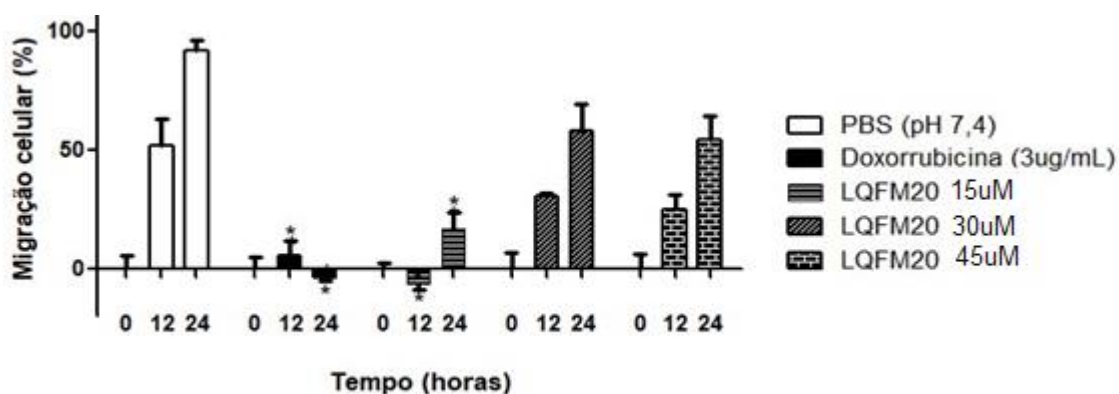
Fonte: A autora, 2018.

4.7 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO E MIGRAÇÃO - "WOUND-HEALING"

A análise do ensaio de cicatrização e migração pelo software TScratch (Instituto Tecnológico de Massachussets, Califórnia, EUA), demonstrou a inibição do perfil migratório das células HuH7 quando tratadas com a droga controle positivo doxorrubicina (3 μ g/mL), e com os compostos LQFM20 e LQFM23.

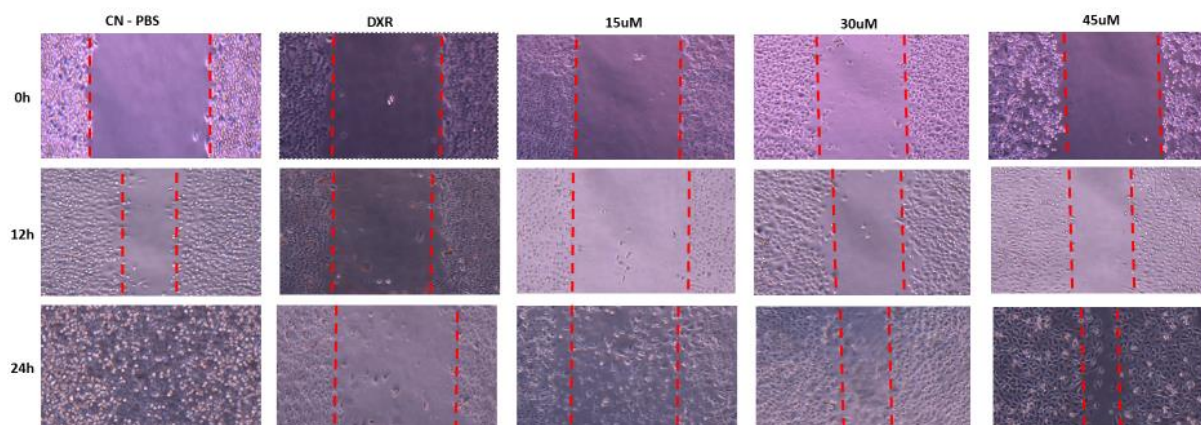
O composto LQFM20 na concentração de 15 μ M (Figura 21, 22) inibiu a taxa migratória após 12 e 24h de tratamento das células HuH7. Para o composto LQFM23 (Figuras 23, 24) as concentrações que alteraram significativamente o processo migratório foram de 10 μ M para o tempo de 24 horas e 40 μ M para ambos os intervalos observados.

Figura 21: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM20.



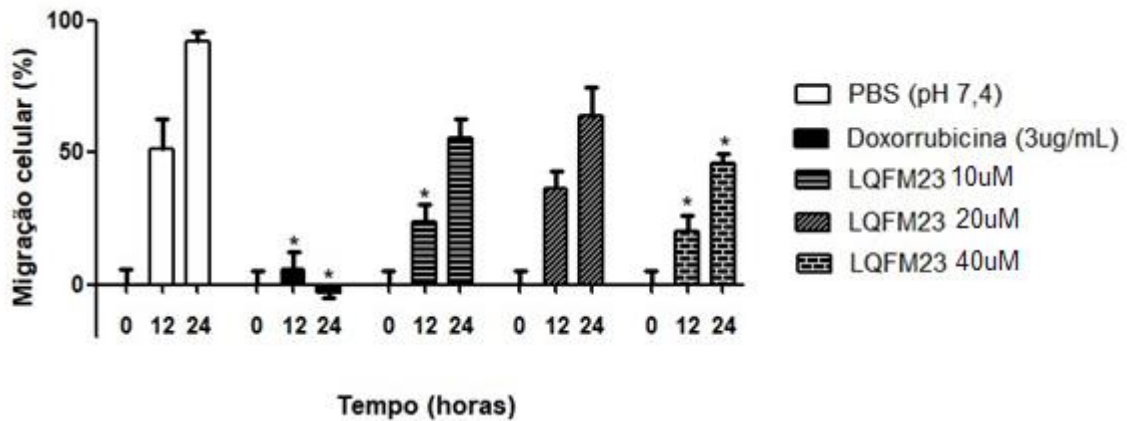
*Valor estatisticamente diferente de PBS ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.
Fonte: A autora, 2019.

Figura 22: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM20. Aumento 20x.



Fonte: A autora, 2019.

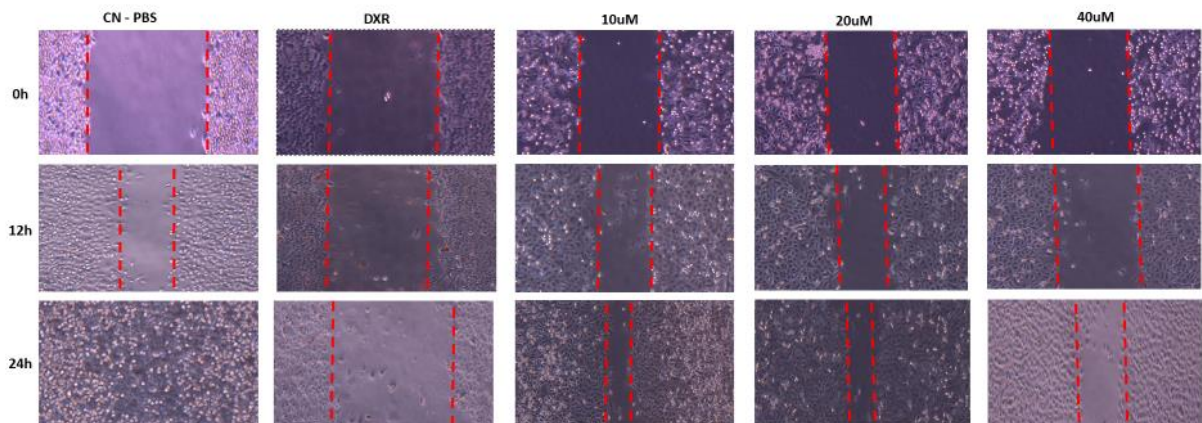
Figura 23: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM23.



*Valor estatisticamente diferente de PBS ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 24: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM20. Aumento 20x.



Fonte: A autora, 2019.

5. DISCUSSÃO

O mercado farmacêutico mundial cresce consideravelmente devido ao aumento da demanda por novos medicamentos. Isto ocorre na tentativa da criação de novos fármacos que possam atuar eliminando os efeitos colaterais causados pelos medicamentos anteriores e potencializando seus efeitos terapêuticos. Para isso há a necessidade de numerosos estudos que gerem informações quanto ao perfil cinético, toxicológico e carcinogênico destes medicamentos, capazes de predizer o seu comportamento *in vivo* antes de iniciar os estudos clínicos em seres humanos (BRASIL, 2013).

A experimentação de novos fármacos segue uma sequência para a definição dos perfis descritos acima. Dentre os ensaios recomendados pelas agências reguladoras mundiais está a avaliação toxicológica *in vitro*; com destaque para os ensaios de citotoxicidade, que têm como objetivo identificar concentrações que levem a possíveis danos celulares e também a concentração citotóxica máxima, a partir da IC₅₀, conforme descrito no guideline 423 da OECD (2001). Recomenda-se ainda estudos genotóxicos que levem à identificação de possíveis danos no DNA. Os resultados obtidos por meio desses ensaios *in vitro* fornecem dados que levam à continuidade dos testes de validação de novos fármacos, como os *in vivo*, de forma mais segura e com menores chances de erro (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2013; FDA, 2017).

A avaliação *in vitro* proporciona a análise de parâmetros associados a eventos bioquímicos que sustentam a viabilidade celular, evidenciando mudanças na integridade da membrana ou no metabolismo. Os resultados obtidos a partir do uso combinado de dois ou mais ensaios levam à redução de fatores de confusão, maior confiabilidade e a previsão de ação dos compostos testes (RISS, MORAVEC, 2004; SPECIAN et al., 2016). Os resultados apresentados neste trabalho utilizando três ensaios diferentes para a avaliação da citotoxicidade estão de acordo com os testes sugeridos pelas agências normalizadoras nacional, ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 2013) e internacionais, como a FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) (2006) e de instituições de interesse na área, como ICH (do inglês - *International Conference on Harmonisation*) (2012), OECD (do inglês *Organization for Economic Cooperation and Development*) (2001), entre outros.

Os compostos LQFM20 e LQFM23 apresentaram diferentes perfis de citotoxicidade entre si e entre os ensaios realizados, porém, a principal característica em comum foi fato de não demonstrarem IC₅₀, visto que nenhum deles diminuiu 50% da viabilidade celular, dentro das concentrações avaliadas. Para o ensaio de quantificação de espécies reativas intracelulares, o composto LQFM20 (30µM), apesar de aumentar a produção de ERs no

tratamento de 1 hora, não promoveu o mesmo resultado nos períodos de 3, 12 e 24 horas, sugerindo recuperação do estado redox celular. As avaliações de morte celular e genotoxicidade não apresentaram resultados significativos. Assim, a análise conjunta dos resultados obtidos nos ensaios citados nos permite sugerir que estes compostos possuem perfis para fármacos, assim como seus medicamentos de origem.

O ensaio do MTT é usado em muitas áreas, especialmente na identificação de novos medicamentos. Kim et al. (2002) avaliaram a citotoxicidade do cilostazol através deste ensaio na presença de indutor de apoptose (lipopolissacarídeo, 1mg/mL) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) *in vitro*, demonstrando aumento da viabilidade celular na presença do fármaco. Quando avaliado na ausência do indutor, a viabilidade chegou a 93,7% na concentração de 10 μ M com tratamento de 5 horas, demonstrando, assim, sua baixa citotoxicidade.

Xie et al. (2018) demonstraram que o fármaco cilostazol, nas concentrações de 5, 10 e 25 μ M apresentou efeito protetor para hepatócitos primários de ratos tratados com etanol, no ensaio de MTT. Ainda não há relatos na literatura para os compostos LQFM20 e LQFM23, sobre a avaliação de citotoxicidade pelo ensaio de MTT, demonstrando assim, a relevância do presente estudo.

Os compostos LQFM20 e LQFM23 apresentaram diferentes perfis na avaliação da viabilidade celular através do ensaio MTT. LQFM20 apresentou apenas uma concentração citotóxica, a de 30 μ M, que inibiu 14,5% da viabilidade celular. O composto LQFM23 mostrou citotoxicidade a partir de 30 μ M. As concentrações dos dois compostos que não se mostraram citotóxicas (Apêndice 1) e apresentam a mesma faixa avaliada por Kim et al. (2002) e Xie et al.(2018) para o fármaco cilostazol. Considerando que a menor concentração avaliada no presente estudo foi de 5 e 10 μ M para, respectivamente, LQFM20 e LQFM23, podemos sugerir que tais compostos não apresentam perigo para uso nas concentrações até 25 μ M.

Agências mundiais como EMEA (*European Medicines Agency*) (2008), ICH (2012), e estudos como o de Specian et al. (2016) entre outros, afirmaram a necessidade de se utilizar diferentes ensaios para se determinar com segurança a citotoxicidade de um novo composto. Dentro deste contexto, no presente estudo, além do ensaio do MTT foram utilizados os ensaios de captação de vermelho neutro e de liberação da enzima LDH.

O ensaio do vermelho neutro permite avaliar a capacidade da atividade lisossomal, uma vez que o corante VN penetra rapidamente nas células através das membranas, sendo aprisionado nos lisossomos, apenas nas células que não apresentam danos nesta organela. Este ensaio, em nosso estudo, apresentou maior sensibilidade para a definição das concentrações citotóxicas dos compostos LQFM20 e LQFM23 na linhagem HuH7. Não há relatos na literatura com referência a este ensaio usando os medicamentos cilostazol, milrinona e o composto LQFM23.

Oliveira et al. (2016) avaliaram a citotoxicidade do composto LQFM20 em fibroblastos de ratos (BALB/3T3), na concentração de 300 μ M, pelo ensaio vermelho neutro e classificaram este composto como categoria 5, segundo a OECD (2001), ou seja, uma substância com um baixo risco de toxicidade aguda *in vivo*. Os dados por nós obtidos *in vitro* nos permitem sugerir que o composto LQFM20 não apresenta perigo de uso na faixa inferior a 15 μ M. Oliveira et al. (2016) também detectaram diferentes atividades farmacológicas, tais como efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e vaso dilatador do LQFM20 (685mg/Kg) *in vivo*.

A agência EMEA (2008) preconiza o uso de ensaios convencionais de citotoxicidade que incluem a avaliação da perda de integridade da membrana ou citólise, como o LDH, na avaliação não clínica *in vitro*. Este ensaio de atividade enzimática LDH detecta danos ao nível da membrana celular; quanto maior a perda de integridade das membranas plasmática e mitocondrial, maior a quantidade de enzima liberada no meio extracelular. Se não ocorrerem danos na membrana, a LDH permanece intracelularmente. O ensaio permite, portanto, correlacionar o nível da atividade da enzima com o nível de morte celular/ danos à membrana (STODDAR, 2011).

Os dados obtidos pelo ensaio LDH demonstraram que o composto LQFM20 não induziu danos severos nas membranas plasmática e mitocondrial e, possivelmente, em seu metabolismo, os quais pudessem levar à morte celular. Este resultado foi comprovado pela ausência de indução de morte (apoptose e necrose) por este composto, observada no presente estudo. Já Xie et al. (2018) demonstraram que o cilostazol diminuiu a liberação de LDH em hepatócitos primários de ratos tratados com etanol, ou seja, apresentou um efeito protetor para estas células.

Apesar do composto LQFM23 não ter induzido o rompimento de membrana plasmática e mitocondrial e, conseqüentemente, liberação da enzima LDH na maioria das concentrações avaliadas, foi observado este fenômeno quando as células foram tratadas com a concentração de 40 μ M. No entanto esse resultado não foi corroborado pelo ensaio com a coloração diferencial usando o brometo de etídio e laranja de acridina, pois essa concentração não promoveu a morte por apoptose ou necrose das células HuH7.

O ensaio para quantificação de ERs intracelulares possibilita a identificação da variação da produção de ERs. O desequilíbrio redox pode levar ao aumento ou diminuição de ERs que levam a modificações nos processos celulares, como proliferação celular, senescência, danos no DNA e morte celular (SIES, 2015). Kim et al. (2002) e Xie et al. (2018) demonstraram o efeito antioxidante do cilostazol *in vitro*, a partir da captura de radicais hidroxila e EROs intracelulares e por meio da inibição de TNF- α e diminuição da expressão de BAX, levando a um efeito anti-inflamatório e antiapoptótico.

No ensaio de quantificação de ERs intracelulares o composto LQFM23 não alterou o estado redox das células HuH7 nas concentrações e tempos avaliados. A concentração de

30 μ M do composto LQFM20 induziu um aumento significativo das ERs após tratamento de 1 hora nas células HuH7. No entanto, os níveis de ERs voltaram ao patamar normal nos tempos subsequentes de tratamento (3,12 e 24 horas), indicando uma recuperação e provável aumento do potencial anti-oxidante celular para protegê-las contra danos causados pelas ERs. Estes dados encorajam a realização de novos estudos para a avaliação de vias de sinalização de reparo da alteração redox nas células HuH7, bem como o possível efeito protetor dos compostos LQFM20 e LQFM23, assim como já realizado com o medicamento cilostazol.

Os resultados obtidos no ensaio do Cometa mostraram, pela primeira vez, que os compostos testes não causam danos no DNA, ou seja, prejuízos que não possam ser reparados pelas células HuH7. Sabendo-se que esta linhagem possui uma mutação pontual no gene *TP53* e que, portanto, não é proficiente nas vias de reparo dependentes deste gene, sugere-se que ambos os compostos avaliados neste estudo não possuem atividade genotóxica. Este fato ainda sugere que os compostos não possuem potencial para serem usados como fármacos quimioterápicos para hepatocarcinoma, nas concentrações avaliadas.

Apesar de não genotóxicos, LQFM20 (15 μ M) e LQFM23 (40 μ M) inibiram, respectivamente, a migração das células HuH7 nos tempos de 12 horas e 12 e 24 horas de tratamento. Estes resultados corroboram os de Dong et al. (2015), na mesma faixa de concentração por nós estudadas, que observaram inibição da migração de células de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231) submetidas a tratamento por 24 horas com milrinona (10 μ M), uma das drogas da qual se originaram os compostos avaliados no presente estudo. Esses resultados analisados em conjunto com os dados obtidos em relação ao medicamento cilostazol por Choi et al. (2018), permitem-nos sugerir que LQFM20 e LQFM23 têm potencial para serem utilizados como fármacos coadjuvantes no tratamento de hepatocarcinoma.

Os compostos LQFM20 e LQFM23 quando aplicados nas células HuH7 apresentaram baixa citotoxicidade, inibição da capacidade migratória celular, ausência de genotoxicidade e de efeitos pró-oxidativos e apoptóticos. Os dados demonstram a importância da realização de testes para avaliação de perigo de novos compostos, pois estes podem auxiliar na definição do perfil toxicológico e na elucidação de seus possíveis mecanismos de ação para sua utilização segura. Diante de relatos da literatura quanto às atividades antioxidantes do cilostazol, sugerimos que os compostos LQFM20 e LQFM23 sejam avaliados também quanto aos seus possíveis efeitos antioxidantes e antiapoptóticos *in vitro*, bem como suas possíveis atividades co-adjuvantes como fármacos quimioterápicos para hepatocarcinoma humano.

Do ponto de vista do desenvolvimento de novos fármacos, devem ser realizados novos testes para que se esclareçam suas possíveis ações farmacológicas e principais vias

envolvidas na alteração do metabolismo celular. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os ensaios realizados sejam também aplicados em linhagens celulares normais e outras linhagens tumorais humanas para melhor definição das atividades biológicas desses promissores compostos para tratamento de doenças cardiovasculares.

Manuscrito**Avaliação citotóxica e genotóxica dos compostos sintetizados LQFM20 e LQFM23 em linhagem celular humana metabolizadora HuH7**

Mariana Stinglin R. Ribas¹, Maiara Piva², Diego Luís Ribeiro³ Cássia Regina P. Cardoso⁴, Fracine Pazini⁴, Roberta Losi- Guembarovski², Ilce Mara S. Cólus²

¹Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁴Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Mato Grossa, Sinop, MT, Brasil

Autor correspondente:

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllós Cólus

Laboratório de Mutagênese e Oncogenética – Departamento de Biologia Geral,

Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, Paraná- Brasil

CEP: 86057-970

Telefone: +55 43 33715149

E-mail: ilcecolus@gmail.com

RESUMO

As doenças cardiovasculares ainda são as principais causas de morte em todo o mundo. Diante disto, há a necessidade de se investigar novos compostos que sejam mais efetivos no tratamento destas enfermidades. A partir da hibridização molecular dos fármacos cilostazol e milrinona, foram desenvolvidos os protótipos LQFM20 e LQFM23. Estes diferem molecularmente pela presença de diferentes radicais na unidade fenilpirazol. Sabendo-se da importância de se avaliar o perigo de novos compostos, o presente trabalho investigou a citotoxicidade, interferência na produção de espécies reativas intracelulares, capacidade de induzir de apoptose/necrose e a genotoxicidade dos mesmos em células HuH7 *in vitro*. Para avaliação da citotoxicidade foram realizados os ensaios de MTT, Vermelho Neutro (VN) e LDH com as concentrações seriadas entre 5 e 45 μ M. A partir dos resultados destes foram selecionadas concentrações citotóxicas para a quantificação de espécies reativas intracelulares (sonda CM-H₂DFCDA), avaliação de apoptose e necrose e genotoxicidade (ensaio cometa). Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e posteriormente por análise de variância (ANOVA), seguido de pós teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn. Nenhum dos compostos avaliados levou à diminuição de 50% da viabilidade celular nos ensaios de MTT e VN. O composto LQFM20, apenas na concentração de 35 μ M, induziu a citotoxicidade pelo ensaio do MTT; no ensaio do VN a citotoxicidade ocorreu a partir de 15 μ M. O composto LQFM23 demonstrou maior seletividade citotóxica para HuH7 em ambos os ensaios, MTT e VN, sendo as faixas significativas encontradas a partir de 5 μ M. No ensaio LDH apenas LQFM23 induziu citotoxicidade significativa na concentração de 40 μ M. As avaliações de espécies reativas intracelulares, morte celular e genotoxicidade não indicaram danos significativos nas células tratadas com os dois compostos avaliados. Diante dos dados obtidos e dos poucos relatos na literatura, é possível sugerir a realização de novas investigações para melhor compreensão dos mecanismos de ação de ambos os compostos, os quais serão fundamentais para avaliar suas possíveis ações terapêuticas.

PALAVRAS- CHAVE: Fosfodiesterase 3 (PDE3). MTT. Vermelho neutro. Lactato desidrogenase. Morte celular. Cometa.

INTRODUÇÃO

Segundo a OPAS (*Organização Pan-americana de Saúde*) e a OMS (*Organização Mundial da Saúde*), as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte no mundo. Na tentativa de diminuir o número de óbitos referentes a essas enfermidades, os órgãos competentes nacionais e internacionais sugerem que se efetive a prevenção e o tratamento dessas doenças [1]. Uma das formas de atuação dos fármacos utilizados para este controle é através da regulação do potencial de contratilidade do músculo cardíaco e da musculatura lisa do endotélio vascular. A ação desses medicamentos se faz através da indução ou inibição de estímulos hormonais e elétricos, regulação das atividades de segundos mensageiros das vias de sinalização de contratilidade muscular, controle intracelular de fluxo de íons, bem como da inibição de enzimas de controle das vias como as fosfodiesterases [2].

Dentre as enzimas fosfodiesterases, a PDE3 (fosfodiesterase3) se destaca na produção de fármacos para o controle das DCV, pois é responsável pela regulação das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e guanosina monofosfato cíclico, regulando processos como a contratilidade cardíaca, agregação plaquetária e relaxamento da musculatura lisa [2,3]. Sabendo da importância deste mecanismo, o desenvolvimento de fármacos que regulem esta via é de grande interesse clínico.

O cilostazol e a milrinona são drogas inibidoras de PDE3, sendo agentes vasodilatadores potentes usados para controlar as DCV. No entanto, a administração destes medicamentos pode levar a efeitos colaterais como cefaleia, taquicardia, palpitações entre outras patologias relacionadas [4,5]. Diante dos efeitos colaterais desses vasodilatadores, existe a necessidade de se investigar novos compostos que levem a menores efeitos adversos com maior efetividade farmacológica. A partir da hibridização molecular destes fármacos, foram desenvolvidos dois protótipos LQFM20 – 5-[1-(4-fluorfenil)-1H-pirazola-4-il]-2Htetrazola e LQFM23 - 5-[1-(3-clorofenil)-1H-pirazola-4-il]-2H-tetrazola. Os compostos pirazólicos como LQFM20 e LQFM23 têm sido relatados como potenciais drogas vasodilatadoras e ainda com possíveis atividades antimicrobiana, antidepressiva, anticonvulsivante, anti-pirética, analgésica e anti-inflamatória [6].

Para liberação para uso humano, as agências reguladoras internacionais exigem que os compostos sejam inicialmente avaliados usando ensaios *in vitro*.

Nestes são mensuradas a capacidade citotóxica, indução de danos no DNA e a capacidade de reparo da célula [7]. Sabendo da importância destes ensaios para a produção de novos fármacos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade, atividade anti-migratória e de cicatrização e a genotoxicidade dos compostos sintetizados LQFM20 e LQFM23 em linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HuH7) *in vitro*, contribuindo para sua indicação como possíveis quimioterápicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

LINHAGEM TUMORAL DE FÍGADO - HUH7 E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A linhagem HuH7 foi estabelecida por Nakabayshi, H. e Sato, J, da *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank – JCRB Cell Bank* (JCRB0403 HuH7) e foi gentilmente cedida ao laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON- Universidade Estadual de Londrina, BR) pelo Dr. Juliano Bordignon do Instituto Carlos Chagas, FioCruz- PR. Foi cultivada em frascos de cultura com capacidade de 60mL e área de crescimento de 25cm², em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, CAS: 12657-029, Gibco) e penicilina 0,06 g/L (CAS: 113-98-4, SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA), estreptomicina 0,10 g/L (CAS: 3810-74-0, SigmaAldrich). Os cultivos foram mantidos em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa.

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRATAMENTO PARA LQFM20 E LQFM23

Os compostos LQFM20 e LQFM23 foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Química Farmacêutica (UFG-BR) e pela Prof^a Dr^a Cássia Regina Primila Cardoso (UFMT- BR). Estes foram diluídos em solução de PBS com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO P.A., A.C.S.–LabsynthLtda, São Paulo, BR), produzindo soluções estoque de 10mM para ambos os compostos, armazenadas a -20°C. A partir destas foram realizadas diluições para serem utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, quantificação de espécies reativas, apoptose/necrose, migração e genotoxicidade. As concentrações escolhidas foram baseadas nos estudos de Shor[8] após ensaios de citotoxicidade com cilostazol e de Pazini[9] que realizou ensaios de citotoxicidade com LQFM20 *in vitro* e *in vivo*.

ENSAIOS DE CITOTOXICIDADEPREPARO DE PLACAS

Para todos os ensaios de citotoxicidade (MTT, VN, LDH e quantificação de espécies reativas (placas escuras) (ERs) foram semeadas 1×10^4 células por poço em placas de cultura de 96 poços, as quais foram estabilizadas durante 24 horas com meio de cultura completo. Para os tratamentos, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4 – para todos os experimentos) e em seguida as células foram tratadas com os compostos-testes nas concentrações seriadas, em meio de cultura sem soro bovino fetal, por 24h.

MTT

O ensaio de MTT seguiu o protocolo descrito por Mosmann [10]. Foram utilizados como controle de solvente (DMSO - 0,1%) e como controle negativo (PBS pH7,4). Após os tratamentos serem removidos, foram adicionados a cada poço 100 μ L de solução de 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, CAS: 57360-69-7, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,5mg/mL) dissolvido em meio de cultura completo e, então em cada poço, realizada uma incubação por 4 h. O meio contendo a solução de MTT foi removido e foram adicionados 200 μ L de DMSO em cada poço. A absorbância foi mensurada usando espectrofotômetro (Biotek Elx800 – Winooski, EUA) com comprimento de onda de 570nm. A porcentagem (%) de viabilidade celular foi obtida pela relação entre as absorbâncias dos poços de cada tratamento e as absorbâncias dos poços do controle negativo, o qual é considerado como 100% de viabilidade celular.

ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO - VN

O ensaio de captação de VN seguiu o protocolo descrito por Repetto, Del Peso e Zurita [11]. Foram utilizados como controle de solvente (DMSO - 0,1%) e controle negativo (PBS pH7,4). Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 100 μ L da solução de VN (CAS: 553-24-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (40 μ g/mL) a cada poço e a placa foi incubada durante 3 h. Posteriormente, o meio contendo a solução de VN foi retirado, as células lavadas com PBS e 150 μ L da solução alcoólica de extração [50mL:49mL:1mL v/v/v (etanol 96%/água destilada/ácido acético glacial)] foram adicionados a cada poço. Por fim, a placa foi rapidamente homogeneizada até o VN ser extraído e formar uma solução homogênea, que foi analisada por espectrofotômetro (Biotek Elx800 – Winooski, EUA) em comprimento de onda de 540nm para obtenção da absorbância. A porcentagem (%) de viabilidade celular foi obtida pela relação entre as absorbâncias

dos poços de cada tratamento e as absorbâncias dos poços do controle negativo, o qual é considerado como 100% de viabilidade celular.

ENSAIO DE LIBERAÇÃO DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE - LDH

Foi utilizado o kit colorimétrico *Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit* (ThermoScientific™, EUA). Foram utilizados como controles de solvente (DMSO - 0,1%), controle negativo (PBS pH7,4) e controle positivo (tampão de lise - ThermoScientific - Pierce®). Foram realizados todos os procedimentos orientados pelo protocolo do kit utilizado. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 490nm (cristal de formazan) e 680nm (resíduo de fundo) (Biotek Elx800 – Winooski, EUA). Portanto, dos resultados obtidos para determinação da atividade de LDH, subtraiu-se do valor de absorbância de 680nm, aquele obtido com 490nm. O valor final representa a quantidade da enzima LDH liberada.

ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (ERs)

Para a determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas, utilizou-se a sonda CM-H₂DCFDA (General Oxidative Stress Indicator - Invitrogen®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para verificar o potencial de oxiredução dos dois compostos, as células foram tratadas nos tempos de 1, 3, 12 e 24 h. Foram utilizadas as concentrações de 15, 30 e 45µM do composto LQFM20 e 10, 20 e 40µM do composto LQFM23, escolhidas a partir dos resultados dos ensaios prévios de viabilidade celular. Em seguida aos tratamentos foram adicionados 5M (100µL por poço) de CM- H₂DCFDA, deixando-se as placas por 30 minutos em estufa. Para o controle positivo foram adicionados peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 2µM) por 20 minutos. Após este intervalo foram realizadas duas lavagens com PBS, e adicionados 100µL de PBS por poço para leitura, que foi realizada em leitor de placas com fluorescência Victor (PerkinElmer®, Waltham, USA), na faixa de excitação de 492 – 495 e de emissão de 517 – 527nm. Os resultados obtidos foram apresentados em unidades arbitrárias referentes a intensidade de fluorescência emitida pela reação entre a sonda e as ERs.

ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE

Utilizou-se do protocolo descrito por McGahon et al. [12]. Esta técnica baseia-se em uma coloração diferencial das células com os corantes fluorescentes laranja de acridina (LA - (CAS: 494-38-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e brometo de etídeo (BE – CAS: 1239-45-8, Sigma-Aldrich). Foram semeadas 0,1x10⁶ células por poço em placas de 24 poços e posteriormente tratadas por 24 horas com os

compostos sintetizados na concentração 45 μ M para LQFM20 e 40 μ M para LQFM23. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e com controles negativo (PBS, pH7,4) e positivo (Doxorrubicina - 3 μ g/mL, Adriamycin—CAS: 23214-92-8, Sigma-Aldrich), conforme Specian et.al. [13]. Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas (trypsin 0.05 %—CAS: 25300-054—Gibco) e 25 μ L da suspensão celular foram misturados a 10 μ L da solução de coloração (100 μ g/mL de LA e 100 μ g/mL de BE). Após homogeneização o conteúdo foi colocado sobre lâminas limpas, cobertas com lamínulas e analisadas 600 células por tratamento (200 por replicata) em microscópio de fluorescência Nikon (Melville, EUA), com filtro de excitação de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm.

ENSAIO COMETA - SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS

O ensaio utilizado seguiu o protocolo descrito por Tice et al. [14]. Foram semeadas 1x10⁵ células em placa de 24 poços, estabilizadas por 24 h em meio de cultura completo, e em seguida tratadas por 4 h em meio de cultura livre de SBF, com diferentes concentrações de cada composto (LQFM20 – 18,8 μ M, 37,5 μ M, 75 μ M e 112,5 μ M e LQFM23 - 10 μ M, 20 μ M e 40 μ M) que foram selecionadas a partir dos ensaios de citotoxicidade anteriores e das estimadas IC₅₀. Em seguida, foi determinada a viabilidade celular pela técnica de exclusão por azul de tripan, utilizando-se o equipamento de contagem de células Countess® AutomatedCellCounter (Life Technologies - Carlsbad, EUA). As culturas que apresentaram viabilidade celular superior a 80% foram submetidas ao ensaio cometa. Uma alíquota de 20 μ L da suspensão celular foi homogeneizada com 120 μ L de agarose LMP “*lowmelting point*” 0,5% e aplicada em lâminas pré-preparadas com uma camada de agarose NMP “*normal melting point*” 1,5% de ponto de fusão normal. As lâminas foram submetidas a solução de lise (4°C) (2,5M NaCl; 100mM ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA); 10nM Tris; 10% DMSO; 1% Triton X-100, pH 10) por 1 h e 30 minutos. Em seguida, foram incubadas por 20 minutos em tampão de eletroforese (0,3MNaCl; 1mM EDTA, pH 13) (4°C) para a desnaturação e então submetidas à eletroforese alcalina (0,25V; 300mA; por 20 minutos).

Após a corrida, as lâminas foram submetidas à solução de neutralização (Tris 0,4M; pH 7,5; 15min) e fixadas em álcool etílico absoluto 99,9% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 5 minutos. As lâminas foram mantidas a 4°C, e antes da análise, coradas individualmente com 40 μ L de GelRed™ (Biotium - Fremont, EUA), [1:10.000 v/v (Gel Red: PBS)] e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Melville, EUA),

com filtro de excitação de 450-490nm e filtro de emissão (barreira) de 515nm, em objetiva de 40x. A análise das lâminas foi realizada por meio do software Comet Imager versão 2.2 © (MetaSystems, Newton, EUA. Para cada imagem captada foram considerados os parâmetros *TailIntensity* (referente à porcentagem de DNA na cauda) e *TailMoment* (que considera a migração do material genético, bem como a quantidade relativa de DNA na cauda).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

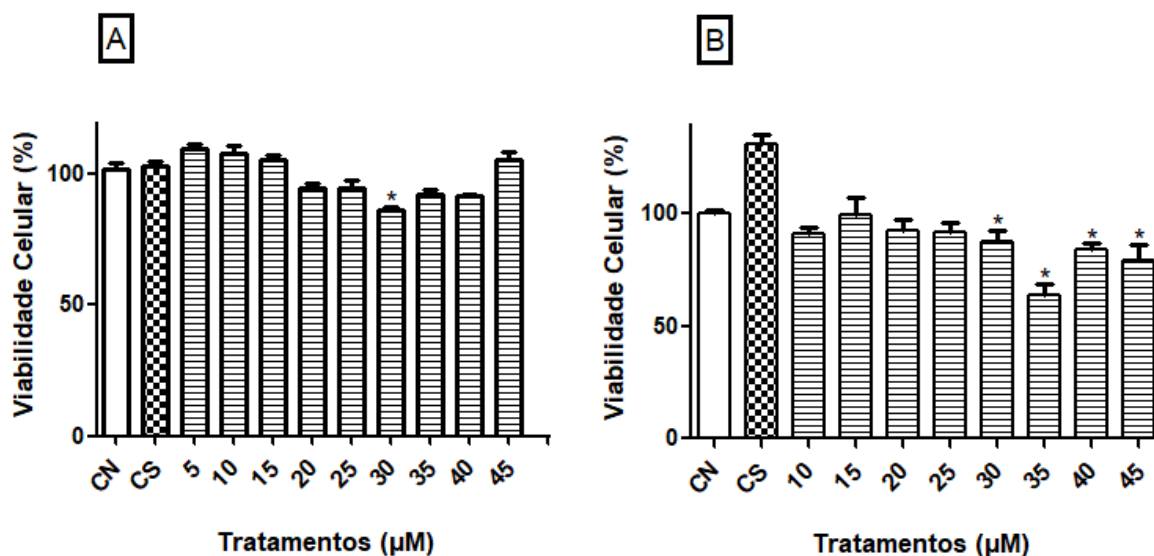
Os dados experimentais foram analisados com o software GraphPadPrism® Versão 6, (La Jolla – EUA). Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e os dados com distribuição homogênea foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de pós teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de comparação múltipla de Dunn. Considerou-se o valor de $p < 0,05$ e o intervalo de confiança (IC) de 95% para todas as metodologias avaliadas.

RESULTADOS

MTT

O composto LQFM20 apresentou citotoxicidade, diminuindo 14,5% da viabilidade celular na concentração de 30 μ M, conforme demonstrado na Figura 1A e Tabela 1.1 do Apêndice 1. Já o composto LQFM23 apresentou citotoxicidade em concentrações iguais ou superiores a 30 μ M, sendo que 35 μ M diminuiu 35,85% da atividade metabólica celular, conforme Figura 1B e Tabela 1.2 do Apêndice 1. Nenhum dos compostos foi capaz de diminuir o crescimento em 50% da população celular; seus valores de IC₅₀ foram estimados para os dois compostos foi de 112,7 μ M para LQFM20 e 93,4 μ M para LQFM23.

Figura 25: Viabilidade de células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20 (A) e LQFM23 (B) por meio do ensaio de MTT.



CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura.

* Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$);

Teste de Kruskal-Wallis, pós- teste de comparação múltipla de Dunn (aplicado A);

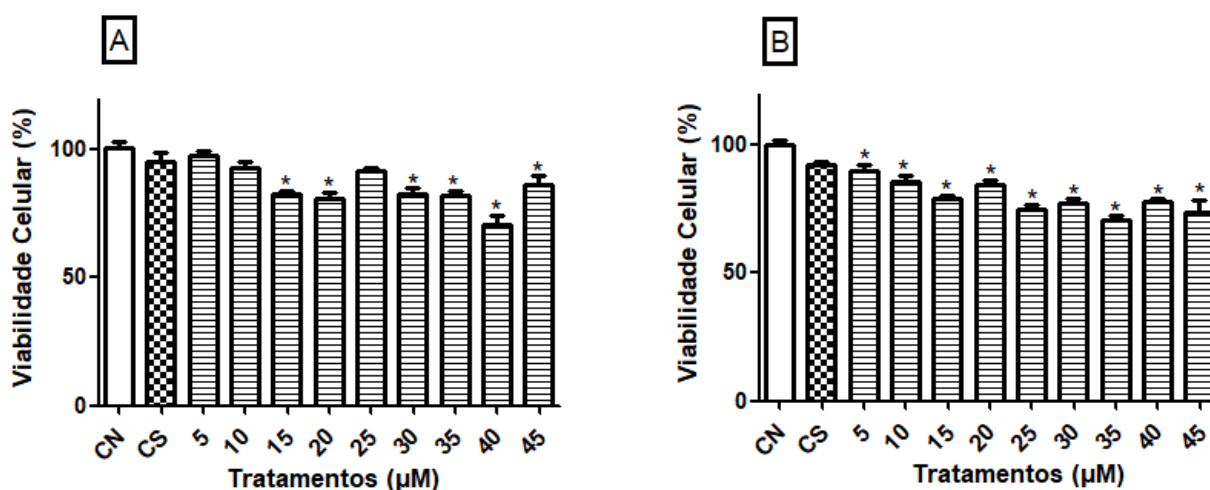
ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey (aplicado B).

Fonte: A autora, 2018.

ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO

Ambos os compostos não foram capazes de diminuir 50% do metabolismo lisossomal. Porém, LQFM20 reduziu a viabilidade celular a partir de 15 μM sendo que a concentração 40 μM redução foi de 29,48% do metabolismo celular lisossomal. LQFM23 apresentou citotoxicidade a partir de 50 μM sendo que a concentração de 35 μM inibiu 30,62% do metabolismo celular lisossomal. Os dados obtidos neste ensaio estão demonstrados na Figura 2A e B e Tabelas 1.3 e 1.4 do Apêndice 1.

Figura 2: Viabilidade de células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20 (A) e LQFM23 (B) por meio do ensaio de vermelho neutro.



CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

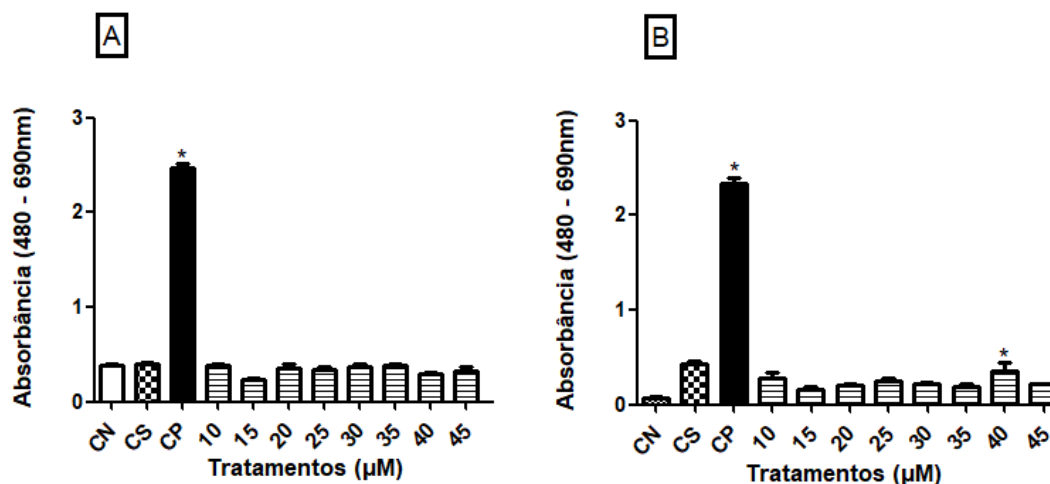
ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA- LDH

Na análise da liberação da enzima lactato desidrogenase apenas o composto LQFM23 na concentração de 40µM apresentou aumento significativo quando comparado ao controle negativo conforme demonstrado na Figura 3A e B e Tabelas 1.5 e 1.6 do Apêndice 1.

AValiação de MORTE CELULAR

Os dados obtidos no ensaio por meio da coloração diferencial das células HuH7 tratadas por 24 h com os compostos LQFM20 (45µM) e LQFM23(40µM), não foram estatisticamente diferentes dos controles utilizados para os dois tipos de morte analisados, conforme demonstrado na Tabela 1.

Figura 3: Avaliação da atividade da enzima lactato desidrogenase em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20 (A) e LQFM23 (B).



CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo, tampão de lise Thermo Scientific – Pierce.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

Tabela1 : Número de células HuH7 viáveis, apoptóticas e necróticas, observadas no ensaio de Apoptose/Necrose, após tratamento por 24 horas com os compostos LQFM20 e LQFM23.

| TRATAMENTO | Células HuH7 | | |
|----------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| | VIÁVEIS | APOPTÓTICAS | NECRÓTICAS |
| CN | 174,6 ± 6,8 | 15,4 ± 7,3 | 10 ± 4,6 |
| CP | 138,3 ± 15,9* | 38 ± 15,0* | 23,6 ± 6,6* |
| LQFM20 45 μ M | 171,3 ± 10,0 | 20,6 ± 11,2 | 8 ± 1,73 |
| LQFM23 40 μ M | 166 ± 2,6 | 24,6 ± 4,0 | 9,33 ± 2,3 |

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino).

CP: controle positivo (Doxorrubicina, 3 μ g/mL).

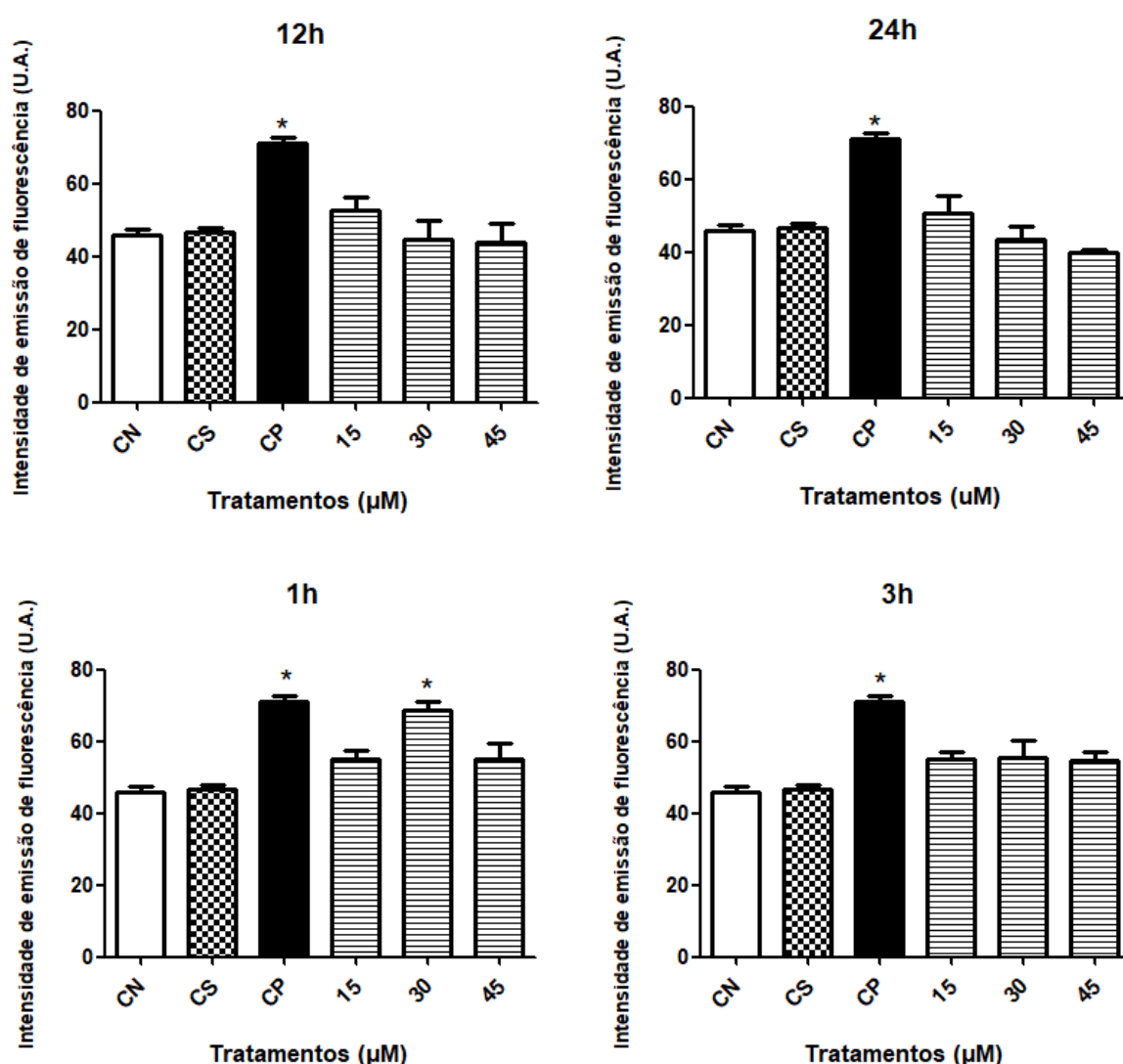
*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (ERs) INTRACELULARES

Os resultados do ensaio de quantificação de ERs indicaram que após os tratamentos de 1, 3, 12 e 24 h com os compostos LQFM20 e LQFM23 não houve alteração do estado redox das células HuH7 em nenhuma das concentrações avaliadas com exceção das células tratadas por 1h com o composto LQFM20 (30 μ M), conforme demonstrado nas Figuras 4 e 5.

Figura 4: Quantificação de ERs intracelular em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento de 1, 3, 12 e 24 horas com o composto LQFM20.

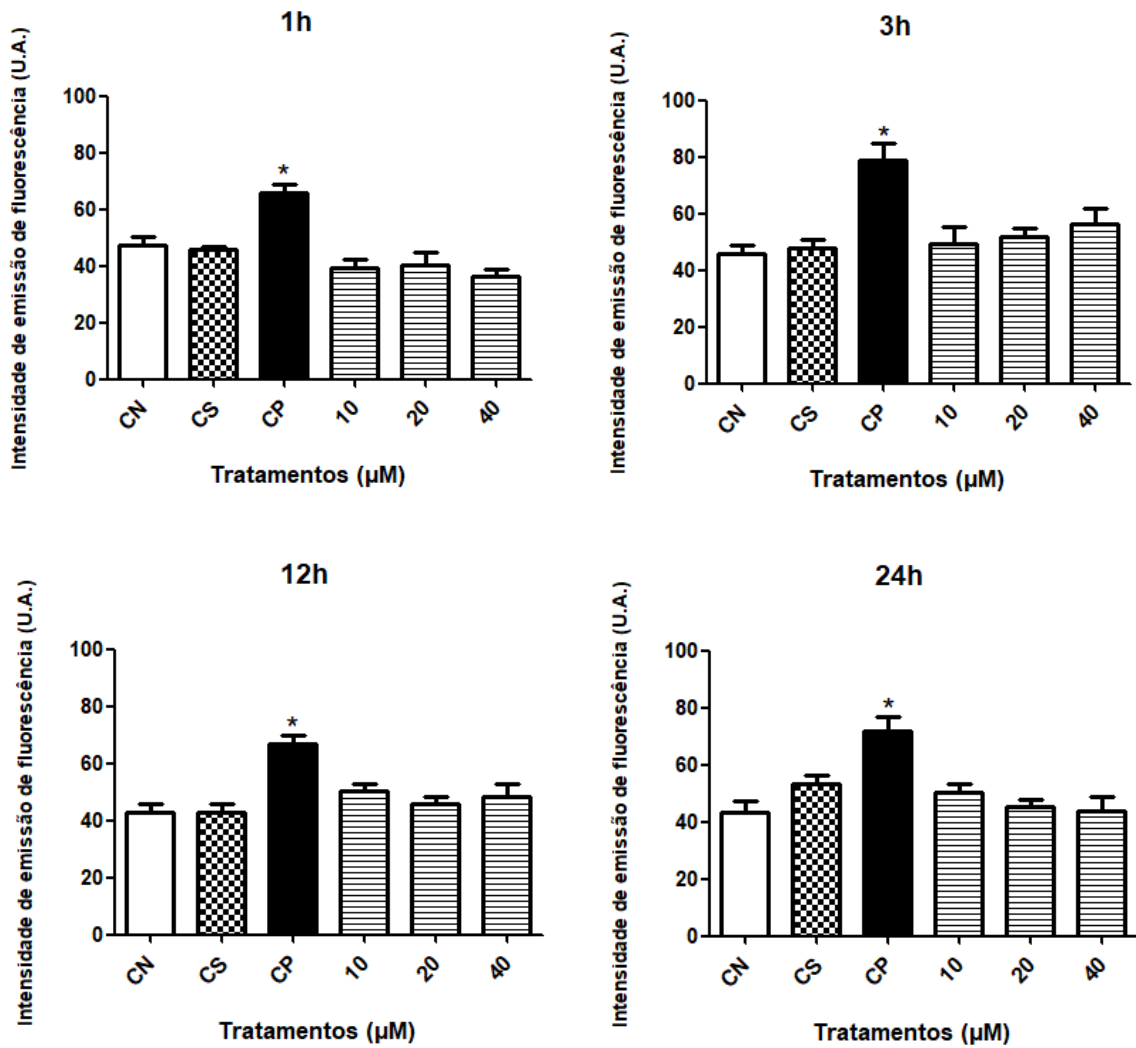


CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo (peróxido de hidrogênio 30% concentração de 2 μ M).

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 5: Quantificação de ERs intracelular em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento de 1, 3, 12 e 24 horas com o composto LQFM23.



CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo (peróxido de hidrogênio 30% concentração de 2μM).

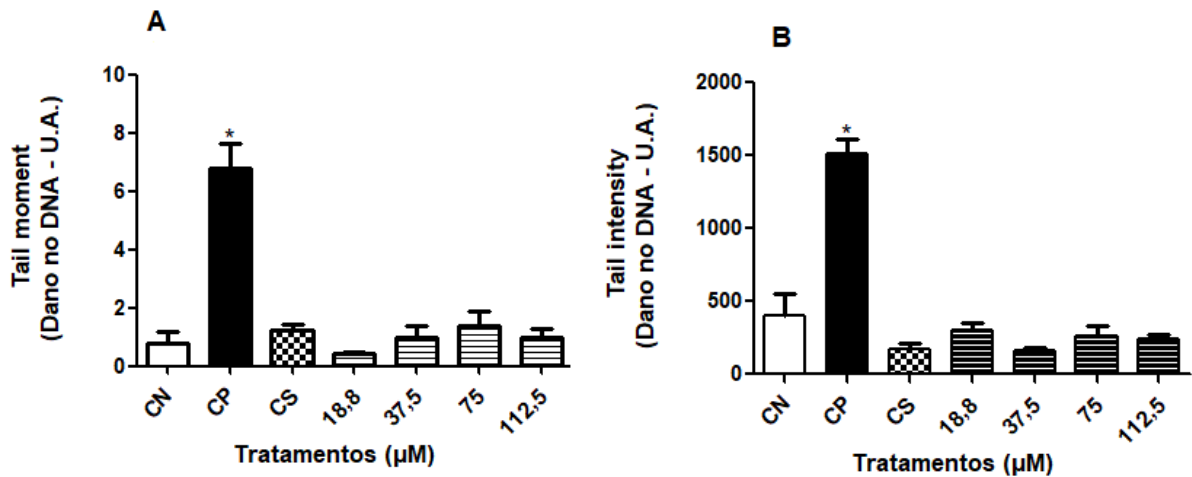
*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

ENSAIO DE GENOTOXICIDADE – COMETA

Todas as culturas que apresentaram viabilidade celular superior a 80% quando submetidas ao ensaio cometa. A análise do ensaio do cometa nos sugere que nenhum dos compostos apresentou atividade genotóxica significativa em nenhuma das concentrações avaliadas, conforme a Figura 6. Doxorrubicina (3 μ g/mL) aumentou significativamente a porcentagem de dano no DNA das células HuH7 após tratamento por 4 horas (Figuras 6 e 7).

Figura 6: Avaliação da genotoxicidade (parâmetros *Tail moment* (A), *Tail intensity* (B)) em células humanas de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento por 4 h com os compostos LQFM20.



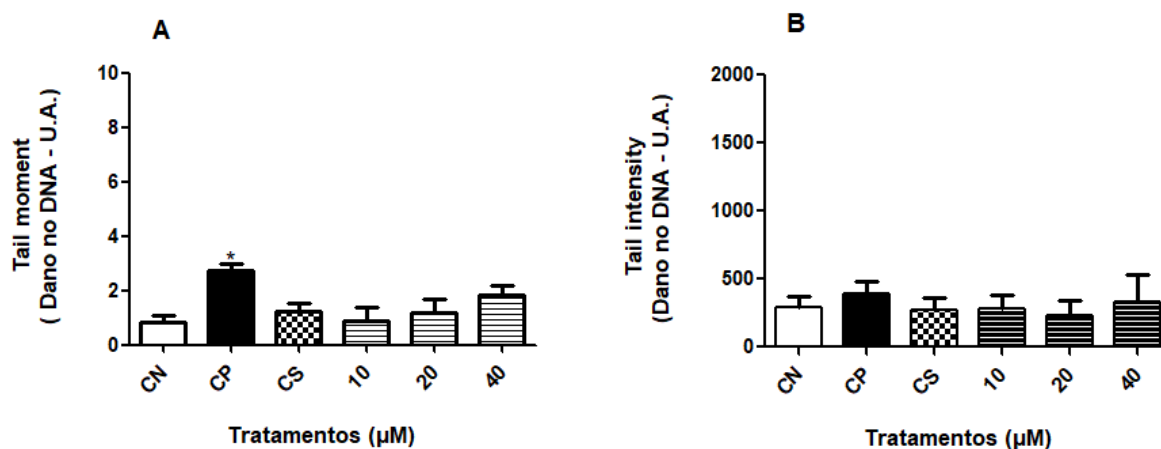
U.A.: unidades arbitrária.

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo, Doxorrubicina 3 μ g/ mL.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 7: Avaliação da genotoxicidade (parâmetros *Tail moment* (A), *Tail intensity* (B)) em células humanas de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento por 4 h com os compostos LQFM23.



U.A.: unidades arbitrária.

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo, Doxorubicina 3μg/ mL.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

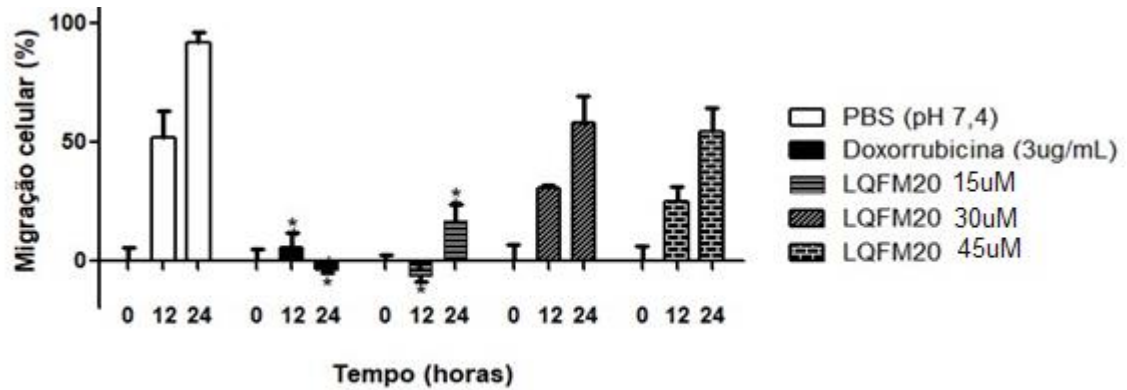
Fonte: A autora, 2018.

ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO E MIGRAÇÃO - “WOUND-HEALING”

A análise do ensaio de cicatrização e migração pelo software TScratch (Instituto Tecnológico de Massachussets, Califórnia, EUA), demonstrou a inibição do perfil migratório das células HuH7 quando tratadas com a droga controle positivo doxorubicina (3μg/mL), e com os compostos LQFM20 e LQFM23.

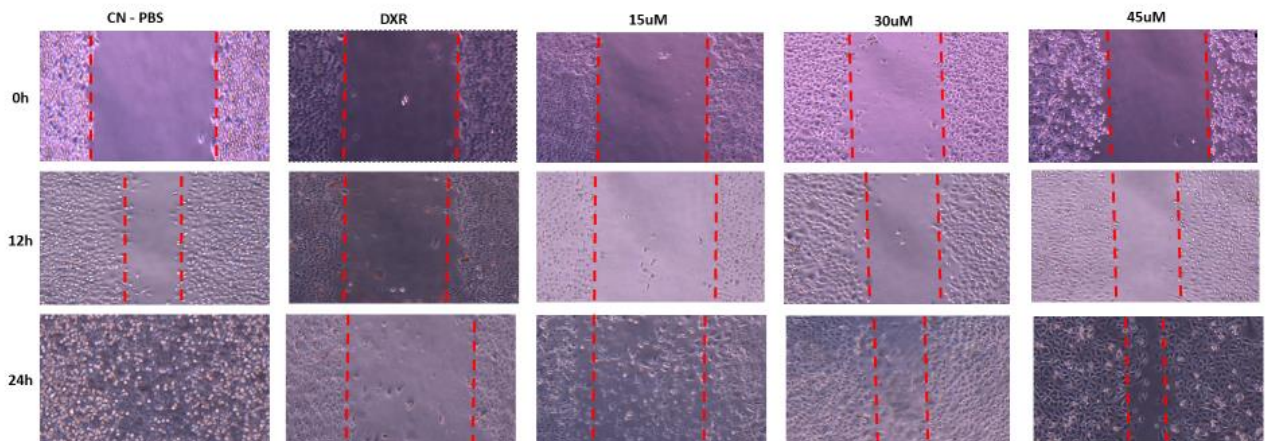
O composto LQFM20 na concentração de 15μM (Figura 8, 9) inibiu a taxa migratória após 12 e 24h de tratamento das células HuH7. Para o composto LQFM23 (Figuras 10, 11) as concentrações que alteraram significativamente o processo migratório foram de 10μM para o tempo de 24 horas e 40μM para ambos os intervalos observados.

Figura 8: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM20.



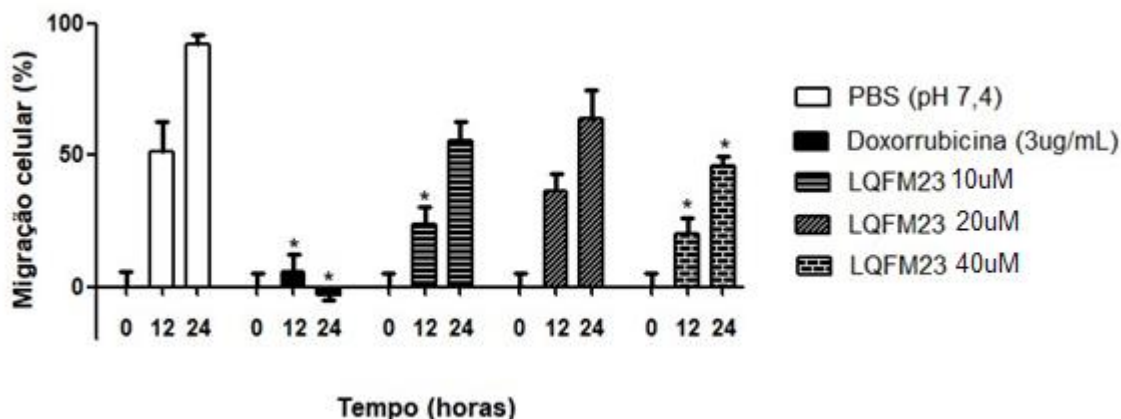
*Valor estatisticamente diferente de PBS ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.
Fonte: A autora, 2019.

Figura 9: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM20. Aumento 20x.



Fonte: A autora, 2019.

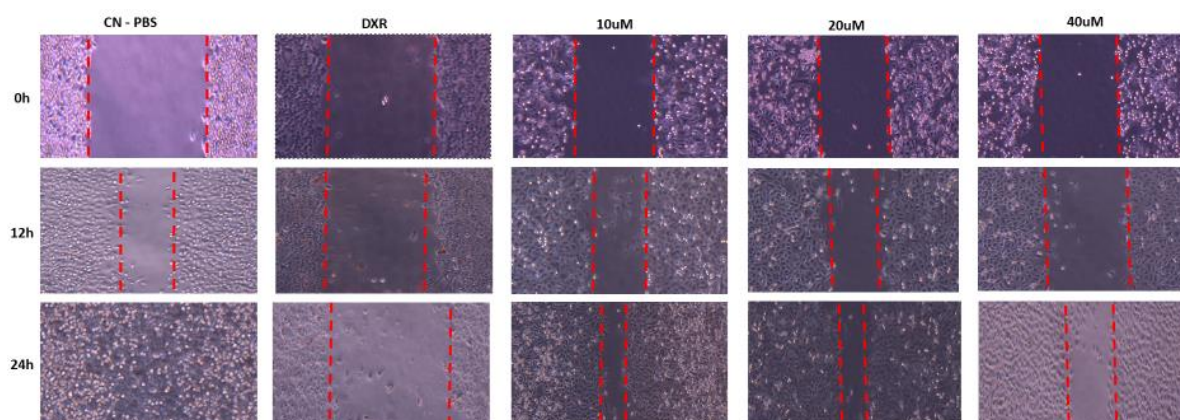
Figura 10: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM23.



*Valor estatisticamente diferente de PBS ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 11: Avaliação do potencial de cicatrização e migração nas células de hepatocarcinoma (HuH7) após tratamento de 24 horas com o composto LQFM23. Aumento 20x.



Fonte: A autora, 2019.

DISCUSSÃO

O mercado farmacêutico mundial cresce consideravelmente devido ao aumento da demanda por novos medicamentos. Isto ocorre na tentativa da criação de novos fármacos que possam atuar eliminando os efeitos colaterais causados pelos medicamentos anteriores e potencializando seus efeitos terapêuticos [15]. Dentre os ensaios recomendados pelas agências reguladoras mundiais estão os ensaios de avaliação toxicológica em modelos *in vitro* [15,16].

A avaliação *in vitro* proporciona a análise de parâmetros associados a eventos bioquímicos que sustentam a viabilidade celular, evidenciando mudanças na integridade da membrana ou no metabolismo. Os resultados obtidos a partir do uso combinado de dois ou mais ensaios levam à redução de fatores de confusão, maior confiabilidade e a previsão de ação dos compostos testes [13,17].

Os compostos LQFM20 e LQFM23 apresentaram diferentes perfis de citotoxicidade entre si e entre os ensaios realizados, porém, a principal característica em comum foi o fato de não terem demonstrado IC₅₀ nos ensaios de citotoxicidade, visto que nenhum deles diminuiu 50% do crescimento celular, dentro das concentrações avaliadas. Para o ensaio de quantificação de espécies reativas intracelulares, o composto LQFM20 (30µM) apesar de ter alterado a produção de ERs no tratamento de 1 hora, não promoveu o mesmo resultado nos períodos de 3, 12 e 24 horas. As avaliações de morte celular e genotoxicidade não apresentaram resultados significativos, o que nos permite sugerir que estes compostos possuem perfis para fármacos, assim como seus medicamentos de origem.

O ensaio MTT é usado em muitas áreas, especialmente na identificação de novos medicamentos. Kim et al. [18] avaliaram a citotoxicidade do cilostazol através deste ensaio na presença de indutor de apoptose (lipopolissacarídeo, 1mg/mL) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) *in vitro*, demonstrando aumento da viabilidade celular na presença do fármaco. Quando avaliado na ausência do indutor, a viabilidade chegou a 93,7% na concentração de 10µM com tratamento de 5 horas, demonstrando assim sua baixa citotoxicidade.

Xie et al. [19] demonstraram que o fármaco cilostazol, nas concentrações de 5, 10 e 25µM, apresentou efeito protetor para hepatócitos primários de rato tratados com etanol, no ensaio de MTT. Ainda não há relatos na literatura para os compostos LQFM20 e LQFM23 sobre a avaliação de citotoxicidade pelo ensaio de MTT, demonstrando assim, a relevância do presente estudo. Assim, os compostos LQFM20 e LQFM23 apresentaram diferentes perfis na avaliação da viabilidade celular por MTT. As concentrações dos dois compostos que não se mostraram citotóxicas, e são superiores às avaliadas por Kim et al. [18] e Xie et al. [19] para o fármaco cilostazol. Considerando que a menor concentração avaliada no presente estudo foi de 5 e 10µM para, respectivamente, LQFM20 e LQFM23, podemos sugerir que tais compostos não apresentam perigo para uso nas concentrações até 25µM.

O ensaio do vermelho neutro, no presente estudo, apresentou maior sensibilidade para a definição das concentrações citotóxicas dos compostos LQFM20 e LQFM23, na linhagem HuH7. Não há relatos na literatura quanto a este ensaio usando os medicamentos cilostazol, milrinona e o composto LQFM23.

Oliveira et al. [6] avaliaram a citotoxicidade do composto LQFM20 em fibroblastos de ratos (BALB/3T3) na concentração de 300 μ M pelo ensaio vermelho neutro e o classificaram como categoria 5, segundo a OECD [20], ou seja, uma substância com um baixo risco de toxicidade aguda *in vivo*. Os dados por nós obtidos *in vitro*, nos permitem sugerir que o composto LQFM20 não apresenta perigo de uso na faixa inferior a 25 μ M.

Os dados obtidos pelo ensaio LDH demonstraram que o composto LQFM20 não induziu danos severos nas membranas plasmática e mitocondrial e, possivelmente, em seu metabolismo, que pudessem levar à morte celular. Este resultado foi comprovado pela ausência de morte (apoptose e necrose) observada neste estudo em relação a este composto. Xie et al. [19] demonstraram que uma das drogas que deu origem aos dois compostos avaliados no presente estudo, o cilostazol, levou à diminuição da produção de LDH em hepatócitos primários de ratos tratados com etanol, ou seja, apresentou efeito protetor para estas células.

Apesar do composto LQFM23 não induzir o rompimento de membrana plasmática ou mitocondrial e, conseqüentemente, a liberação da enzima LDH na maioria das concentrações avaliadas, este fenômeno foi observado quando utilizada a concentração de 40 μ M. No entanto, esse resultado não foi corroborado pelo ensaio com a coloração diferencial usando brometo de etídio e laranja de acridina, pois essa concentração não promoveu a morte por apoptose ou necrose das células HuH7.

A agência EMEA [21] preconiza o uso de ensaios convencionais de citotoxicidade que incluem a avaliação da perda de integridade da membrana ou citólise, como o LDH na avaliação não clínica *in vitro*. Specian et al. [13] afirmaram que o ensaio LDH entre os ensaios de citotoxicidade por eles utilizados, foi o mais confiável, apresentando menor número de resultados falso positivos ou negativos.

O desequilíbrio redox pode levar ao aumento ou diminuição de ERs que levem a modificações nos processos celulares como a proliferação celular, senescência, danos ao DNA e morte celular [22]. Kim et al. [19] e Xie et al. [20] demonstraram o efeito antioxidante do cilostazol *in vitro*, a partir da captura de

radicais hidroxila e EROs intracelulares e por meio da inibição de TNF- α e diminuição da expressão de BAX, levando a um efeito anti-inflamatório e antiapoptótico.

No ensaio de quantificação do ERs intracelulares do presente estudo, o composto LQFM23 não alterou o estado redox das células HuH7, nas concentrações e tempos avaliados. A concentração de 30 μ M do composto LQFM20 induziu um aumento significativo das ERs após tratamento com 1 hora. No entanto, os níveis de ERs voltaram ao patamar normal nos tempos subsequentes de tratamento (3,12 e 24 horas), indicando uma recuperação do potencial anti-oxidante celular para protegê-las contra os danos causados. Estes dados encorajam a realização de novos estudos para a avaliação de vias de sinalização de restabelecimento do estado redox nas células HuH7, bem como o possível efeito protetor dos compostos LQFM20 e LQFM23, como já realizado no medicamento cilostazol.

Os resultados obtidos no ensaio cometa mostraram, pela primeira vez, que os compostos testes não levam a danos no DNA, em células HuH7. Sabendo-se que esta linhagem possui uma mutação pontual no gene *TP53* e que, portanto, não é proficiente nas vias de reparo dependentes deste gene, sugere-se que ambos os compostos avaliados não possuem atividade genotóxica. Este fato ainda sugere que os mesmos não possuem potenciais para serem usados como fármacos quimioterápicos para hepatocarcinoma, nas concentrações avaliadas no presente estudo.

CONCLUSÕES

LQFM20 e LQFM23 quando aplicados em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) não apresentaram citotoxicidade nas menores concentrações, mostraram ausência de efeitos genotóxicos e de efeitos pró-oxidativos e pró-apoptóticos. Esses dados sugerem ausência de perigo quando da utilização desses compostos para fins terapêuticos. Os achados deste trabalho também demonstram a importância da realização de ensaios para avaliação de perigo que auxiliem na definição do perfil toxicológico dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- [1] BRASIL. Determinantes Sociais e Riscos para a Saúde, Doenças Crônicas não transmissíveis e Saúde Mental: Doenças Cardiovasculares. Organização panamericana da Saúde. Brasília: OPAS; 2017.
- [2] BHOOGAL NK, HASAN A, GORELIK J. The Development of Compartmentation of cAMP Signaling in Cardiomyocytes: The Role of T-Tubules and Caveolae Microdomains. *J Cardiovasc Dev. Dis.* 2018jun;5(2): 25.
- [3] FRANCIS SH, TURKOIV, CORBIN J D Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001 feb; 65:1-52.
- [4] ROSA MP, BARONI G V, PORTAL V L. Cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase III: perspectivas futuras na aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2006nov; 87(5):1-5.
- [5] TANG P, et al. Milrinone for the Treatment of Acute Heart Failure After Acute Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Basic Clin Pharmacology Toxicol.* 2015 sep; 117(3):186-94.
- [6] OLIVEIRA LP, et al. New pyrazole derivative 5-[1-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl]-2H-tetrazole: synthesis and assessment of some biological activities. *Chemi Bio&Drug Design.* 2016sep; 89(1):124-135.
- [7] GILBERT DF, FRIEDRICH O. *Methods in Molecular Biology.* Springer Science, Business Media LLC, U.S.A.: 2017.
- [8] SHRÖR K. The pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab.* 2002; 4:14-19.
- [9] PAZINI Francine. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos protótipos de fármacos vasorelaxantes. 2012, Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2012.
- [10] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 dec; 65(1-2):55-63.
- [11] REPETTO G, DEL PESO A., ZURITA JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008 mar; 7:1125-31.
- [12] Mc GAHON AJ, et al. *Methods in cell biology: The End of the (Cell) Line:*

- Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. Academic Press: 1995; 46:153-185. [13]
- SPECIAN AFL, et al. LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phototherapeutic compounds. *Cytotechnology*. 2016 dec; 68(6):2729–2744.
- [14] TICE, R. R. et al. The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000 jun; 35(3):206-221.
- [15] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a Condução ão de Estudos não Clínicos de Segurança a Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 29 nov. 2018.
- [16] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (423), dec. 2001.
- [17] RISS T, MORAVEC R. Use of Multiple Assay End points to investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, And Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *Assay Drug Dev Technol*. 2002; 2:51-62.
- [18] KIM KJ, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide- Induced Apoptosis by Cilostazol in Human Umbilical Vein Endothelia In Cells. *J. Of Pharmacol And Exp Therapy*. 2002 feb; 300(2):709-715.
- [19] XIEX, et al. Protective effects of cilostazol on ethanol- induced damage in primary cultured hepatocytes. *Cell Stress Chaperones*. 2018 mar; 23(2):203–211.
- [20] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (423), dec. 2001.
- [21] European Medicines Agency (EMA). Committee for medicinal products for human use: non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity. London, jan. 2008.
- [22] SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015 apr; 4:180-183.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nos diferentes ensaios desenvolvidos neste trabalho, podemos concluir que os compostos LQFM20 e LQFM23 não apresentaram genotoxicidade e a citotoxicidade detectada não foi suficiente para matar 50% das células HuH7 quando avaliadas pelos ensaios MTT e vermelho neutro.

No ensaio de liberação da enzima LDH somente o composto LQFM23 induziu danos na membrana plasmática das células. O composto LQFM20 (30 μ M) por outro lado, alterou o estado redox das células HuH7 submetidas a tratamento de 1 hora. Esses poucos resultados significativos observados nos ensaios LDH e de quantificação de ERs não foram associados com nenhum dos tipos de morte celular analisados, pois nenhum dos compostos induziu apoptose ou necrose nas condições avaliadas.

Os compostos LQFM20 (15 μ M) e LQFM23 (40 μ M) inibiram a capacidade migratória das células HuH7 no ensaio de cicatrização, indicando um potencial para uso como co-adjvante na quimioterapia para hepatocarcinomas.

REFERÊNCIAS

ABILEV, S.K.; GLASER, V.M. Genetic toxicology: findings and challenges. **Russian Journal of Genetics**, v.49, e.1, p.70-80, may.2013.

ALOUSI, A.A.; JOHNSON; D.C. Pharmacology of the bipyridines: amrinone and milrinone.

Circulation, [s.l.], v.73, p.10–24, _1986.

ANDRADE, Cintia Delphino. **CEBRALAT®** cilostazol, 2018. Disponível em:< <http://media.netfarma.com.br/bulas/Cebralat-50-mg-P01741LBB00.pdf>>. Acesso em: 22 de outubro de 2018.

AVELAR-FREITAS, B.A.; et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 47, e. 4, p.307-315, mar. 2014.

AZEVEDO,M.F.; et al. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs).

Endocrine Reviews., v.35, e.2, p.195-233, apr. 2014.

BEDIOUNE, I.; et al. Phosphodiesterases des nucleotides cycliques: role dans le cœur et potentiel therapeutique. **Biologie Aujourd'hui**, France, v.210, e.3, p.127-138, _2016.

BEEBE, H.G.; et al. A new pharmacological treatment for intermittent claudication: results of a randomized, multicenter trial. **JAMA Interncional Medicine**, v.159, e.17 p. 2041-50, sep. 1999.

BHOGAL, N.K.;HASAN, A.;GRORELIK, J. The Development of Compartmentation of cAMP Signaling in Cardiomyocytes: The Role of T-Tubules and Caveolae Microdomains. **Journal Cardiovascular Development and Disease**.v.5, e.2. p. 25, jun. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**, 2013. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 29 nov. 2018.

BRASIL. Pesquisa Nacional da Saúde – 2013. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, 2014**. Disponível em:

<<ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>>. Acesso em 04 de fev. 2019.

BRASIL. **Mortalidade: Óbitos por idade e sexo corrigido pelo Busca Ativa Notas Técnicas**. Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-emsaude/vigilancia-de-doencas-cronicas-nao-transmissiveis-dcnt/situacao-epidemiologica>>.

Acesso em 04 de fev. de 2019.

BRASIL. **Determinantes Sociais e Riscos para a Saúde, Doenças Crônicas não transmissíveis e Saúde Mental: Doenças Cardiovasculares**. Organização pan-americana da Saúde, 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencascardiovasculares&Itemid=839>. Acessado em 04 de fev. 2019.

CELL BIOLABS. **Comet Assay Kits, 3-Well**: Comet Assays and Slides. Cell Biolabs, Inc. All Rights Reserved. Website by Best Rank, 2018. Disponível em: <<https://www.cellbiolabs.com/comet-assay-kits-3-well>>. Acesso em 09 de dezembro de 2018.

CHEN,Q.;KANG,J.; FU, C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis.**Signal Transduction and Targeted Therapy**. v.1, p.3:18 , jul.2018.

CHIN, L.K., et al. Production of reactive oxygen species in endothelial cells under different pulsatile shear stresses and glucose concentrations. **Lab on a Chip**, e.11, p. 1856–1863, feb.2011.

CHOI, H.I.; et al. The effect of cilostazol, a phosphodiesterase 3 (PDE3) inhibitor, on human hair growth with the dual promoting mechanisms. **Journal of Dermatological Science**, v.91, e.1, p.60-68, jul. 2018.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, _2004.

COLLINS, A. R., et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.143-151, 17 feb. 2008.

COLLINS, A. R. The comet assay: a heavenly method! **Mutagenesis**, v.30, e.1, p.1-4, jan 2015.

COUPLAND, L. A.; CHONG, B. H.; PARISH, C. R. Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells. **Cancer Research**, v.72, p. 4662–4671, sep. 2012.

DAWSON, D.L. Comparative effects of cilostazol and other therapies for intermittent claudication. **The American Journal Cardiology**, v.87, e.12, p.19D-27D, jun. 2001.
DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M. **Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols**. Humana Press is a brand of Springer, London: 2013.

DIBIANCO, R., et al. A comparison of oral milrinone, digoxin, and their combination in the treatment of patients with chronic heart failure. **The New England Journal of Medicina**, v.320, p.677–83, mar. 1989.

DONG, H., et al. Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling. **Breast Cancer Research and Treatment**,v.152, e.1, p.17-28, jul. 2015.

European Medicines Agency (EMA). **Committee for medicinal products for human use**: non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity. London, jan. 2008. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/draft-non-clinical-guideline-druginduced-hepatotoxicity_en.pdf>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2019.

FLEMING, Y. M.; FRAME, C.Q.; HOUSLAY, M.D. PDE4-regulated cAMP degradation controls the assembly of integrin-dependent actin adhesion structures and REF52 cell migration. **Journal of Cell Science**, v.117, e.11, p. 2377- 2388, jan. 2004.

FLOREANI, M.; et al. New milrinone analogues: in vitro study of structure-activity relationships for positive inotropic effect, antagonism towards endogenous adenosine, and inhibition of cardiac type III phosphodiesterase. **Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [s.l.], v. 367, n. 2, p.109-118, feb. 2003.

Food and Drug Administration (FDA). **Pharmacology and Toxicology**: Guidance for Industry and Review Staff. Silver Spring, USA, jan. 2006. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079257.pdf>>. Acesso em 18 de janeiro de 2019.

Food and Drug Administration (FDA). **Predictive toxicology roadmap**. Silver Spring, USA, dec. 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/scienceresearch/specialtopics/regulatoryscience/ucm587831.pdf>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2018.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A.. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p.171-177, jan. 2006.

FRANCIS, S. H., TURKO, I. V., CORBIN, J. D Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function, **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v.65, n.1, p.52, feb, 2001.

FRIEDL, P., GILMOUR, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.10, e.7, p.445–457, jul. 2009.

GALLOWAY, S.M. International regulatory requirements for genotoxicity testing for pharmaceuticals used in human medicine, and their impurities and metabolites.

Environmental and Molecular Mutagenesis, v.58, e.5, p.296-324. Mar. 2017.

GALLUZZI; L., et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v.1, p.107-20, jan. 2012.

GHIASI, S.; ABDOLLAHI, M. A review on the potential benefits of phosphodiesterase inhibitors in various models of toxicities in animals. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 3, p. 210-224, 2012.

GIL-BERNABE, A. M., LUCOTTI, S.; MUSCHEL, R. J. Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell use. **British. Journal of Haematology**, v.162, e.2, p. 433–441, may. 2013.

GILBERT. D.F.; FRIEDRICH O., **Methods in Molecular Biology**. Springer Science, Business Media LLC, U.S.A.: 2017.

GREEN, D.R.;KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p.626-9, jul.2004.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B.D. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

HALLIWELL, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: Avoiding pitfalls. **Biomedical Journal**, v.3, p.99-105, may. 2014.

HASSAN,M.; et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **Biomed Research International**, v. 2014, p., jun.2014.

HAYASHI, S.; et al. Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. **Hypertension**, v. 35 n.1, e.2, p. 237-43, jan. 2000.

IKEDA, Y., et al. Effects of doxorubicin and/or cilostazol on cancer cells during liver regeneration after two-thirds hepatectomy in rats. **Journal Oncology**, v.55, e.4, p. 354-356, aug. 1998.

ILINA, O.;FRIEDL, P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, e.18, p.3203-8, sep.2009.

IMAI, T.; et al. The phosphodiesterase III inhibitor cilostazol protects the brain microvasculature from collagenase injury. **Neuro Report**, v. 28, n. 10, p.555-560, jul. 2017.
INDOLFI, F.; et al. Inotropic stimulation by dobutamine increases left ventricular regional function at the expense of metabolism in hibernating myocardium. **American Heart Journal**, v.132, p. 542-549, sep. 1996.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Committee for medicinal products for human use: non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity**. European

Medicines Agency, Londres, jan. 2008. Disponível em:
<https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/draft-non-clinical-guideline-druginduced-hepatotoxicity_en.pdf>. Acesso em 19 de jan.2019.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. ICH S2 R1: Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. Geneva, 2012. Disponível em:
<<http://www.ich.org/products/guidelines/safety/safety-single/article/guidance-on-genotoxicitytesting-and-data-interpretation-for-pharmaceuticals-intended-for-human-use.html>>. Acesso em 19 de jan de 2019.

ITO, C., et al. Modulation of the erythropoietin-induced proliferative pathway by cAMP in vascular smooth muscle cells. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 283, n.6, p.1715-21, dec. 2002.

Jl, Z.; BALL, N.S.; LeBARON, M.S. Global regulatory requirements for mutagenicity assessment in the registration of industrial chemicals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.58, e.5, p. 345-353, mai. 2017.

JONKMAN, J.E.; et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion Migration**, v.8, e.5, p.440-51, oct. 2014.

KABIL, S.L. Beneficial effects of Cilostazol on liver injury induced by common bile duct ligation in rats: Role of SIRT1 signaling pathway. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, v.45, e.12, p. 1-37, dec. 2018.

KASAI, F.; et al. HuH-7 reference genome profile: complex karyotype composed of massive loss of heterozygosity. **Human Cell**, v.31, e.3, p.261-267, jul 2018.

KATZUNG, B.G. MASTERS, SB, TREVOR AJ. **Basic & Clinical Pharmacology**. MC Graw Hill Medical companies, USA, e.12, 2013.

KIM, K.J; et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis by Cilostazol in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 300, e. 2, p.709-715, 1 feb. 2002.

KIMURA, Y.; et al. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. **Arzneim-Forsch Drug Research**, v.35, p. 1144-9, jan. 1985.

KIRKLAND, D. Improvements in the reliability of in vitro genotoxicity testing. **Journal Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.7, e.12, p.1513-1520, nov. 2011.

KLAASSEN, C.D. **Fundamentos em toxicologia de Sacarett e Doull**. AMGH Ed. LTDA, 2ed., Porto Alegre: 2012.

KOCKX, M.M. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 18, e.10, p. 1519-22, oct. 1998.

KOPPEN, G, et al. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 32, e. 3, p.397-408, 4 mar. 2017.

KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity.

Journal Immunology Methods, n.64, e.3, p.313-20, nov.1983.

LABELLE, M.; BEGUM, S.; HYNES, R. O. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. **Cancer Cell**, v. 20, e.5, p. 576-90, nov. 2011.

LAKATTA, E.G.; LEVY, D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. **Circulation**, v.107, p. 139-146, jan. 2003.

LEE, J.H. et al. Cilostazol Reduces Atherosclerosis by Inhibition of Superoxide and Tumor Necrosis Factor- Formation in Low-Density Lipoprotein Receptor-Null Mice Fed High Cholesterol. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.313, e.2, p. 5029, may. 2005.

LU, Y.; LIU, Y.; YANG, C. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. **Journal of Visualized Experiment**, e.128, p. 56450, oct. 2017.

LYLE, K. S., et al. cAMP-induced Epac-rap activation inhibits epithelial cell migration by modulating focal adhesion and leading edge dynamics. **Cellular Signalling**, v.20, e.6, p.1104- 1116, jun. 2008.

MAJURE, D.T.; et al. Meta-analysis of randomized trials of effect of milrinone on mortality in cardiac surgery: An update. **Journal Cardiothoracic Vascular Anesthesia**, v.27, e.2, p.220–229, apr. 2013.

MALTA, J.; et al. Risco de contaminação do corante azul de tripano após primeira utilização. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 1, p.27-31, feb. 2006.

MARKS, A.R. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n.1, p.46-5, jan. 2013.

MARONPOT, R.R.; HOBBS, C.A.; HAYASHI, S. Role of pathology peer review in interpretation of the comet assay. **Journal Toxicology Pathology**, v.31, e.3, p.155-161, jul. 2018.

MATHEW, J.P.; et al. A multicenter risk index for atrial fibrillation after cardiac surgery. **JAMA**, v. 291, p. 1720-1729, apr. 2004.

Mc GAHON, A. J.; et al. **Methods in cell biology**: The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. Academic Press, v.46, p. 153-185, _1995.

MONEY, S.R.; et al. Effect of cilostazol on walking distances in patients with intermittent claudication caused by peripheral vascular disease. **Journal Vascular Surgery** v.27, e.2, p.267-74, feb.1998.

MOR, G.; ALVERO, A. B. **Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols**. Human Press is a brand of Springer, U.S.A.: 2015.

MOREIRA, H.S.; et al. Phosphodiesterase-3 inhibitor cilostazol reverses endothelial dysfunction with ageing in rat mesenteric resistance arteries. **European Journal of Pharmacology**, v.5, p. 59-68, mar 2018.

MORISHITA, R. A. scientific rationale for the CREST trial results: Evidence for the mechanism of action of cilostazol in restenosis. **Atherosclerosis Supplements**, v. 6 n.4, p. 41-6, dec. 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, dec. 1983.

MURATA, T.; TAIRA, M.; MANGANIELLO, V.C. Differential expression of cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in human hepatoma cell lines. **FEBS Letters**, v.390, e.1, p.29- 33, jul. 1996.

MURATA, T.; et al. Phosphodiesterase 3 (PDE3): Structure, Localization and Function. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v.7, e. 3, p. 206-211, jul. 2009.

NETHERTON, S. J.; MAURICE, D. H. Vascular Endothelial Cell Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Regulated Cell Migration: Implications in Angiogenesis. **Molecular pharmacology**, v.67, n.1, p.263-271, oct. 2005.

NIKOLETOPOULOU, V.; et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p.3448-3459, dec. 2013.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guideline for testing of chemicals: **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method** (423), dec. 2001. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicityacute-toxic-class-method_9789264071001-en>. Acesso em: 04 de fev. 2019.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD series on testing and assessment. **Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures**. França, 14 de aug. 2001. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264078475en.pdf?expires=1550587135&id=id&accname=guest&checksum=4E348461F33C578D022A68ED09AE1D8B>. Acesso em: 19 de fev.2019.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Genetic toxicology **Guidance Document: Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines**, 31 de aug. 2015. Disponível em: <<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Genetic%20Toxicology%20Guidance%20Document%20Aug%2031%202015.pdf>>. Acesso em: 15 de jan. 2019.

OLIVEIRA, L.P.; et al. New pyrazole derivative 5-[1-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl]-2Htetrazole: synthesis and assessment of some biological activities. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 89, n. 1, p.124-135, sep. 2016.

OMORI, K.; KOTERA, J. Overview of PDEs and their regulation. **Circulation Research**, v. 100, n. 3, p. 309-327, feb. 2007.

OTA, H.; et al. Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular biology**, v.28, e.9, p. 1634-1639, sep.2008.

OTA, H.; et al. Sirolimus and everolimus induce endothelial cellular senescence via sirtuin 1 down-regulation: therapeutic implication of cilostazol after drug-eluting stent implantation. **Journal of the American College of Cardiology**, v.16, e.53, p.2298-305, jun. 2009.

OZAWA, M. Banco de Células JCRB (Coleção Japonesa de Pesquisa Banco de Células Biológicas): JCRB0403 HuH-7. Disponível em: <http://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=385>. Acesso em: 07 de fev. 2019.

PARRY, J. M.; PARRY, E. M. Genetic Toxicology. **Methods In Molecular Biology**, Springer Science, Business Media LLC, U.S.A.: 2012.

PAZINI, Francine. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos protótipos de fármacos vasorelaxantes**. 2012, Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2012.

PEREZ, M.G.; et al. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 535, p.43-46, out. 2017.

PUBCHEM a. **OPEN CHEMISTRY DATA BASE**: Cilostazol. Disponível em: <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2754>. Acesso em: 4 de fev.2019.

PUBCHEM b. **OPEN CHEMISTRY DATA BASE**: Milrinone. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/46507838#section=Top>>. Acesso em: 4 de fev.2019.

QIN, C.D.; et al. Astragaloside IV inhibits metastasis in hepatoma cells through the suppression of epithelial-mesenchymal transition via the Akt/GSK-3 β / β -catenin pathway.

Oncology Reports, v.37, e.3, p. 1725-1735, mar. 2017.

REPETTO, G.;DEL PESO, A.;ZURITA, J.L.Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocol**, v.7, p.1125-31, mar. 2008.

RISS, T.; MORAVEC, R. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, And Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays.

Assay Drug Development Technologies, v. 2, e.1 p. 51-62, jul. 2004.

RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J.L. **Methods in Molecular Biology**: Cell Migration: Developmental Methods and Protocols. Edited by: J-L. Guan © Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005.

ROSA, M.P.; BARONI, G. V.; PORTAL, V. L. Cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase III: perspectivas futuras na aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, e. 5, p.1-5, nov. 2006.

RYBALKIN, S. D.; et al. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. **Circulation Research**, v. 93, e. 4, p. 280-291, aug. 2003.

SACHET, M.; LIANG, Y. Y.; OEHLER, R. The immune response to secondary necrotic cells. **Apoptosis**, v.22, e.10, p. 1189–1204, oct. 2017.

SHAKUR, Y.; et al. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v.66, p.241-277, 2001.

SHRÖR, K. The pharmacology of cilostazol. **Diabetes Obesity Metabolism**, v.4, p.14-19, 2002.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v.4, p.180-183, apr. 2015.

SINGH, N.P.; et al. Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, e.1, p.184-191, mar.1988.

SPECIAN, A.F.L.; et al. LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds.

Cytotechnology, v.68, e.6, p. 2729–2744, dec. 2016.

STODDART, M.N.J. **Mammalian Cell Viability: Methods In Molecular Biology**. Humana Press, p.1-253, 2011.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols Immunology**, v.111, A3. B.1-3, nov.2015.

TAKAGI, T; et al. Cilostazol ameliorates collagenase-induced cerebral hemorrhage by protecting the blood–brain barrier. **Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 37, e. 1, p.123-139, 22 jul. 2016.

TANG, P.; et al. Milrinone for the Treatment of Acute Heart Failure After Acute Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.117, e.3, p. 186–194, jan. 2015.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit**. USA, 2014.

Disponível em: < https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?id=man0011851&version=a.0&pdfurl=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011851_Pierce_LDH_Cytotoxicity_Asy_oG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogIFBpZXJjZSBMREggQ3I0b3RveGljaXR5IEFzc2F5IEtpdA= =>. Acesso em 21 de fev.2019.

TICE, R.R.; et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, e.3, p.206–221, jun. 2000.

UY, B.; MCGLASHAN, S. R.; SHAIKH, S. B. Measurement of Reactive Oxygen Species in the Culture Media Using Acridan Lumigen PS-3 Assay. **Journal Biomolecular**

Techniques, v.22, e.3, p.95-107, sep. 2011.

van TONDER, A.; JOUBERT, A.M.; CROMARTY, A.D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v. 8, e.47, p. , fev 2015.

VEDULA, S.R.; et al.. Collective cell migration: a mechanistic perspective. **Physiology Bethesda**, v. 28, e.6, p.370-379, nov.2013.

WOJTALA, A., et al. Chapter Thirteen - Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. **Methods in Enzymology**,v.42, p. 243-262, 2014.

WU, D.; YOTNDA, P. Production and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancers. **Journal of Visualized Experiments**, n. 57, p. 3357, 2011.

XIE, X.; et al. Protective effects of cilostazol on ethanol-induced damage in primary cultured hepatocytes. **Cell Stress Chaperones**, v.23, e.2, p. 203–211, mar.2018.

YING, Y.; PADANILAM, B. J. Regulation of necrotic cell death p53, PARP1 and Cyclophilin D-overlapping pathways of regulated necrosis? **Cell Molecular Life Science**, v. 73, e. 11-12, p. 2309–2324, jun. 2016.

YU, L.X.; et al. Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein. **Nature communications**, v.28, p. 5256, oct. 2014.

ZACCOLO, M. cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. **British Journal of Pharmacology**, v.158, e. 1, p. 50–60, aug. 2009.

APÊNDICE 1

Tabela 1.1: Viabilidade células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com o composto LQFM20 por meio do ensaio de MTT.

| HuH7 | CN | CS | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Viabilidade % | 100,00 | 102,85 | 109,14 | 110,41 | 103,93 | 91,45 | 91,16 | 85,46 | 89,98 | 91,85 | 100,59 |
| Desvio Padrão | 7,31 | 5,71 | 5,22 | 7,25 | 5,91 | 5,58 | 8,18 | 4,54 | 4,81 | 0,41 | 7,80 |
| Significância | | ns | ns | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns | ns |

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); **NS:** valores não significativos

Teste de Kruskal-Wallis, pós- teste de comparação múltipla de Dunn;

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 1.2: Viabilidade células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com o composto LQFM23 por meio do ensaio de MTT.

| HuH7 | CN | SC | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
|---------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Viabilidade % | 100,00 | 130,86 | 91,15 | 99,45 | 92,71 | 91,59 | 87,51 | 64,15 | 83,80 | 79,06 |
| Desvio padrão | 1,65 | 4,41 | 2,44 | 7,87 | 4,82 | 4,13 | 5,15 | 4,62 | 3,06 | 7,16 |
| Significância | | | ns | ns | ns | ns | * | * | * | * |

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); **NS:** valores não significativos

ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 1.3: Viabilidade células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com o composto LQFM20 por meio do teste de vermelho neutro.

| HuH7 | CN | CS | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Viabilidade % | 100,00 | 95,94 | 96,25 | 93,75 | 82,81 | 82,19 | 91,88 | 82,81 | 82,81 | 69,38 | 84,69 |
| Desvio Padrão | 6,22 | 8,72 | 4,68 | 5,66 | 2,58 | 5,47 | 3,27 | 6,42 | 5,43 | 9,65 | 9,85 |
| Significância | | ns | ns | ns | * | * | ns | * | * | * | * |

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); **NS:** valores não significativos

ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 1.4: Viabilidade células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento por 24 horas com o composto LQFM23 por meio do teste de vermelho neutro.

| HuH7 | CN | CS | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Viabilidade % | 100,00 | 92,35 | 89,89 | 85,88 | 78,71 | 84,20 | 74,78 | 77,31 | 70,52 | 77,59 | 73,43 |
| Desvio padrão | 5,51 | 3,51 | 6,00 | 6,44 | 4,05 | 5,01 | 5,04 | 4,27 | 4,94 | 3,44 | 11,38 |
| Significância | | ns | * | * | * | * | * | * | * | * | * |

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); **NS:** valores não significativos

ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 1.5: Avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento 24 horas com o composto LQFM20.

| HuH7 | CN | CS | CP | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Atv LDH | 0,379 | 0,403 | 2,134 | 0,380 | 0,232 | 0,360 | 0,343 | 0,375 | 0,380 | 0,291 | 0,322 |
| Desvio Padrão | 0,070 | 0,038 | 0,955 | 0,038 | 0,042 | 0,101 | 0,084 | 0,056 | 0,048 | 0,054 | 0,117 |
| Significância | | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo, tampão de lise Thermo Scientific – Pierce.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 1.6: Avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase em células de hepatocarcinoma humano (HuH7) após tratamento 24 horas com o composto LQFM23.

| HuH7 | CN | CS | CP | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Atv LDH | 0,10 | 0,12 | 1,41 | 0,13 | 0,11 | 0,12 | 0,11 | 0,13 | 0,14 | 0,17 | 0,16 |
| Desvio Padrão | 0,01 | 0,02 | 0,19 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,02 | 0,02 |
| Significância | | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | * | ns |

CN: controle negativo (PBS, tampão fosfato salino); **CS:** controle solvente (DMSO, dimetilsulfóxido) 0,1% em cultura; **CP:** controle positivo, tampão de lise Thermo Scientific – Pierce.

*Valor estatisticamente diferente de CN ($p \leq 0,05$); ANOVA, pós- teste comparação múltipla de Tukey

Fonte: A autora, 2018.