



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCAS MILANEZ BENICIO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIALCITOTÓXICODE UMA NOVA
INDOLIN-3-ONA E DE SEUS EFEITOS SOBRE A
MODULAÇÃO GÊNICA EM CÉLULAS HEPG2**

Londrina
2014

LUCAS MILANEZ BENICIO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIALCITOTÓXICO DE UMA NOVA
INDOLIN-3-ONA E DE SEUS EFEITOS SOBRE A
MODULAÇÃO GÊNICA EM CÉLULAS HEPG2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Marcelo Tempesta de Oliveira

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B467a	<p>Benicio, Lucas Milanez. Avaliação do potencial citotóxico de uma nova indolin-3-ona e de seus efeitos sobre a modulação gênica em células HepG2/ Lucas Milanez Benicio. – Londrina, 2014. 68 f.: il.</p> <p>Orientador: Marcelo Tempesta de Oliveira. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.. Inclui bibliografia</p> <p>1. Células cancerosas – Teses. 2. Oncogenes – Teses. 3. Genética – Expressão – Teses. 4. DNA – Teses. 5. Indolinona – Teses. I. Oliveira, Marcelo Tempesta. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 576.385.5</p>
-------	---

LUCAS MILANEZ BENICIO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIALCITOTÓXICODE UMA NOVA INDOLIN-
3-ONA E DE SEUS EFEITOS SOBRE A MODULAÇÃO GÊNICA EM
CÉLULAS HEPG2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. Marcelo Tempesta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler
Universidade de São Paulo – USP

Profa. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de Fevereiro de 2014.

Ao meu pai, Antônio Carlos Benício.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Rosalina por me apoiarnesse caminho que escolhi seguir, pelas ligações, orações, pela roupa lava e passada, pela comida feita com tanto carinho e por todo amor que sempre tem comigo. Ao meu irmão Gustavo, que apesar de parecer a pessoa mais distante do mundo sempre me trazia um lanche pra eu não desmaiar de fome enquanto escrevia essas páginas noite adentro.

Ao meu orientador, Marcelo Tempesta de Oliveira, pelos ensinamentos, por estar sempre muito presente, por ter o maior espírito de cientista que conheço com muita curiosidade e especulações, sempre com bastante ânimo apesar de todas as dificuldades.

À Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus pela oportunidade de trabalhar e de desenvolver a minha pesquisa de mestrado em seu laboratório, além de seus ensinamentos desde quando era minha orientadora na graduação, e também por sua amizade e companheirismo.

À equipe de cientistas e amigos do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética: Diego, Marilesia, Helô, Valéria, Maressa, Rossana, Anaih, Higor, Lorena e em especial a Ana Flávia, Lígia, Katuska e Juliana Mara, que apesar de não me deixarem trabalhar, me divertiam muito entre um café, uma pipoca e outra. Obrigado pela ajuda na realização dos experimentos, por escutarem (e aguentarem) minhas reclamações e pelas horas de descontração que passamos no laboratório e fora dele.

Aos meus muitos amigos que “sofreram” junto comigo essa experiência de fazer mestrado: Cínthia, Perla, Bruna Lunardelli, Mari Hertel, Ceci, Luciana Gama e Naiara, que me entendiam a cada conversa, cada disciplina cursada, ou ministrada, a cada prazo de entrega não cumprido, entre tantas outras situações que o mestrado nos coloca. À Carina, Josi, Lara e Marília, que passaram por tudo isso longe e mesmo assim davam um jeito de sempre estarem próximas, por meio das mensagens, ligações e visitas surpresas.

Aos meus irmãos de coração, Thiago, Victor e Giba pela parceria e amizade em todos os momentos, nos bons, e nem tão bons assim. Ao Juninho e Laís que chegaram à pouco e de repente, mas pra ficar. Ao Zeca, que mesmo sem entender nada de genética também me ajudou, de um jeito que antes eu não

conhecia. Às amigas mais antigas: Luciana Filgueiras, por ser tão parecida comigo, por me entender tão bem e pela amizade que só aumenta; à Bruna Triana pela amizade incontestável e o maior carinho de todos; à Larissa Fernandes que de seis em seis meses trazia sua amizade e parceria pra perto; e à Bruna Caroline (Braw) e Larine pelos finais de semana divertidos em Cornélio. E dentre tantos outros amigos que participaram da minha vida durante esse período e contribuíram para que ela fosse mais feliz de alguma maneira.

À Universidade Estadual de Londrina pela infraestrutura para que esta pesquisa fosse desenvolvida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro fornecido durante o mestrado.

Ao programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular representado pela coordenadora Profa. Dra. Ana Lúcia Dias e pela secretária Maria Sueli Trindade Miranda, sempre muito queridas e prestativas.

Aos técnicos Dário e Melissa pelo apoio na realização das tarefas básicas do laboratório.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade Filho e ao Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior pela obtenção da indolin-3-ona e parceria na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani por ceder a infraestrutura do Laboratório de Genética Toxicológica e parceria na realização deste trabalho.

À banca examinadora por dispor de seu tempo pra contribuir com a melhoria deste manuscrito.

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira na minha vida durante estes dois anos de mestrado e que não citei aqui, mas não por falta de gratidão.

A Deus por ter me dado forças pra continuar nas inúmeras vezes em que pensei, “eu não aguento mais”, e graças a Ele vou poder dizer: “Sou mestre!”

Muito obrigado!!!

BENICIO, Lucas Milanez. **Avaliação do potencial citotóxico de uma nova indolin-3-ona e de seus efeitos sobre a modulação gênica em células HepG2.** 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

As indolinonassão moléculas farmacologicamente importantes, conhecidas por sua atividade inibidora de proteínas quinases, exibindo efeitos promissores no tratamento do câncer e outras doenças. Apesar das diferentes abordagens para a terapia e prevenção do câncer, esta doença continua a ser uma das principais causas de morte no mundo. Seus tratamentos atuais apresentam efeitos indesejados, fazendo com que novos compostos e terapias sejam necessários. A fim de contribuir para a solução deste problema, o presente estudo visou avaliar o potencial citotóxico, antiproliferativo e genotóxico de uma nova indolin-3-ona, assim como seu efeito na expressão de genes relacionados ao câncer. O composto apresentou efeito citotóxico sobre eritrócitos humanos apenas a partir da concentração de 32 µg/mL nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Foi observado que os efeitos citotóxicos e antiproliferativo da indolin-3-ona sobre a linhagem celular HepG2, mensurados pelo ensaio do MTT, foram dose-tempo-dependentes, se intensificando de acordo com a variável em questão. O ensaio do cometa mostrou que a indolin-3-ona possui atividade genotóxica nas concentrações de 16 e 24 µg/mL, contudo, este ensaio detecta danos primários ao DNA que ainda podem ser reparados pelo sistema de reparo de DNA da célula. A partir dos ensaios de RT-qPCR foi possível observar que a indolin-3-ona modula a expressão de genes envolvidos no processo de carcinogênese, reprimindo a expressão gênica, principalmente de proto-oncogenes, também de forma dose-tempo-dependente. Estes resultados apontam para a indicação desta indolinona como uma nova molécula com potencial utilização na terapia do câncer.

Palavras-chave: Indolinona. HepG2. Proto-oncogenes. Supressores tumorais. RT-qPCR.

BENICIO, Lucas Milanez. **Evaluation of cytotoxic potential of a novel indolin-3-one and its effects on gene modulation in HepG2 cells.** 2014. 68 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The indolinones are pharmacologically important molecules known for their inhibitory activity of protein kinases, showing promising effects in treatment of cancer and other diseases. Despite the different approaches for therapy and prevention of cancer, it remains a major cause of death worldwide. Its current treatments have unwanted effects, making new compounds and therapies needed. In order to solve this problem, the present study aimed to evaluate the cytotoxic, antiproliferative and genotoxic potential of a new indolin-3-one and its effect on expression of genes related to cancer. The compound showed cytotoxic effect on human erythrocytes only at concentrations above 32 µg/mL at times of 24, 48, 72 and 96 hours of treatment. The indolinone cytotoxic and antiproliferative effects on HepG2 cells, measured by the MTT assay, were dose-time-dependent, intensifying according to the variable in question. The comet assay revealed that indolinone has genotoxic activity at concentrations of 16 and 24 µg/mL, however, this assay detects only primary DNA damages, which can still be repaired by the DNA repair system of the cell. In RT-qPCR assays we could observe that indolinone modulates the expression of genes involved in the carcinogenesis process, suppressing the gene expression, specially of proto-oncogenes, also in a dose-time-dependent manner. These results point to the indication of this indolinone as a new molecule with potential use in cancer therapy.

Key words: Indolinone. HepG2. Proto-oncogenes. Tumor suppression genes. RT-qPCR.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	O CÂNCER	10
2.2	GENES SUPRESSORES TUMORAIS E PROTO-ONCOGENES	11
2.3	TERAPIAS ALTERNATIVAS ANTICÂNCER	12
2.4	INDOLINONAS.....	13
2.5	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	14
2.5.1	Ensaio de Hemólise	14
2.5.2	Ensaio do MTT.....	14
2.5.3	Ensaio de Exclusão pelo Azul de Tripán.....	15
2.6	ENSAIO DE GENOTOXICIDADE – ENSAIO DO COMETA	15
2.7	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	16
2.8	GENES	17
2.8.1	Gene MET	17
2.8.2	Gene c-MYC	18
2.8.3	Genes CCND1 e CDK4	18
2.8.4	Gene CDKN2A.....	19
2.8.5	Gene CCNA2.....	20
2.8.6	Gene E2F1	21
2.8.7	Gene BIRC5	21
2.8.8	Genes BAX e BCL-XL.....	22
2.8.9	Gene TP53	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVOS GERAIS	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4	ARTIGO	26
5	CONCLUSÕES GERAIS	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICES	63

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa uma das mais devastadoras doenças em todo o mundo. A cirurgia, as quimioterapias e radioterapias, tratamentos convencionais atualmente empregados para o combate desta doença, são onerosos e desencadeiam uma série de efeitos adversos que reduzem significativamente a qualidade de vida dos pacientes (BABAN et al., 2010; CAO; CRIPPS; WEY, 2010). Desta forma, há crescente necessidade em descobrir drogas e/ou terapias anticâncer que sejam, no mínimo, mais seletivas e menos tóxicas quando comparadas às atualmente utilizadas e, em uma melhor perspectiva, mais eficazes para o combate ao câncer.

A emergência de novas terapias que se baseiam na alteração de características moleculares dos tumores, a exemplo das terapias gênicas, surge com a promissora perspectiva de um dia encerrar a necessidade da utilização de procedimentos invasivos e deletérios como a quimioterapia, radioterapia e intervenções cirúrgicas (BABAN et al., 2010; CAO; CRIPPS; WEY, 2010). E, o conhecimento sobre as anormalidades moleculares e metabólicas das células cancerosas fornecem oportunidades para o surgimento de novas terapias (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Enquanto isso, por não existir uma terapia única que seja confiável para a erradicação do câncer, a combinação de tratamentos convencionais com a utilização de técnicas complementar esse tornou essencial (BABAN et al., 2010; CAO; CRIPPS; WEY, 2010).

A exploração da biodiversidade e o estudo de extratos e compostos de origem natural, em busca de substâncias com propriedades terapêuticas, se fazem cada vez mais importantes para a evolução da medicina e consequente melhoria da qualidade de vida e bem estar da humanidade (ALONSO-CASTRO et al., 2011; BABAN et al., 2010; CAO; CRIPPS; WEY, 2010).

A pesquisa de substâncias naturais que promovam alterações benéficas na expressão de genes comprovadamente envolvidos em processos tumorais se torna uma alternativa interessante a ser explorada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O CÂNCER

Nas últimas décadas, o câncer se tornou um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e, conseqüentemente, um dos principais focos de estudos científicos da área médica e de pesquisas farmacêuticas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou para o ano de 2030 27 milhões de novos casos de câncer e 17 milhões de mortes em decorrência desta doença (INCA, 2011).

O câncer é uma doença genética de origens multifatoriais ocasionada pelas perdas do controle da proliferação celular e da ativação de vias pró-apoptóticas, capacitando as células a invadirem tecidos próximos ou migrarem para locais mais distantes no organismo, caracterizando as metástases (PINTO; FELZENSWALB, 2003). Entre as causas que levam ao crescimento desordenado de células estão a suscetibilidade genética hereditária e os agentes ambientais químicos, físicos e biológicos, aos quais estamos expostos cotidianamente. Estes fatores exógenos são denominados agentes mutagênicos, pois são capazes de induzir mutações no DNA, seja por meio de inserção, deleção ou substituição de bases, definidas como mutações gênicas, ou por translocação, inversão, ganho ou perda de cromossomos, denominadas mutações cromossômicas (ERDTMANN, 2003).

A mutação, de uma forma geral, é qualquer mudança súbita e herdável no genótipo de um organismo que não é resultante de eventos de recombinação gênica (PIERCE, 2011). As mutações em células somáticas estão intrinsecamente ligadas ao mecanismo de carcinogênese, uma vez que os agentes mutagênicos podem causar danos irreparáveis no DNA, resultando em uma célula iniciada (FLORA; FERGUSON, 2005). Entretanto uma única mutação não é suficiente para desencadear esse processo. Para que ocorra a expansão clonal de células tumorais é necessário que haja um acúmulo de mutações no material genético de uma célula que não sejam reversíveis pelos mecanismos de reparo. Assim, para ocorrer alteração na regulação do ciclo celular, é necessário que os genes envolvidos neste processo sofram danos irreparáveis (SARASIN, 2003).

Além dos eventos genéticos relacionados ao processo de carcinogênese, que já estão bem descritos, atualmente tem se demonstrado que

eventos epigenéticos também são cruciais para o desenvolvimento e progressão do câncer (TABY; ISSA, 2010).

O termo epigenética se refere a modificações bioquímicas, tais como metilação e acetilação, na estrutura da cromatina, herdáveis e reversíveis, que refletem em mudanças na expressão gênica, porém não acompanhadas de mudanças na sequência de DNA (JONES; BAYLIN, 2007; TABY; ISSA, 2010). Em adição, a metilação aberrante do DNA e histonas, a metilação de proteínas não-histonas, tais como fatores de transcrição, também estão relacionados à biologia e desenvolvimento do câncer (MONTENEGRO et al., 2014). Desta forma, o reconhecimento dos eventos epigenéticos que ocorrem em células tumorais e as alterações do perfil de expressão gênica promovidas pelos mesmos também podem contribuir para o desenvolvimento de terapias anticâncer (MUND; LYKO, 2010).

2.2 GENES SUPRESSORES TUMORAIS E PROTO-ONCOGENES

Ao contrário de doenças como a fibrose cística ou a distrofia muscular, por exemplo, em que mutações em apenas um gene podem causar a doença, no câncer, um único gene mutado não desencadeia o processo neoplásico, com exceção dos cânceres hereditários. Alterações em três tipos de genes são responsáveis pela tumorigênese: os proto-oncogenes, os supressores tumorais e os genes de reparo de DNA (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Mutações em proto-oncogenes e genes supressores tumorais funcionam de forma similar a nível fisiológico: elas conduzem o processo neoplásico aumentando o número de células por meio da estimulação da proliferação celular e da inibição de morte ou da parada do ciclo celular. Uma primeira mutação nesses genes que cause um aumento na proliferação celular inicia o processo neoplásico. Mutações subsequentes resultam em expansão clonal adicional e, conseqüentemente, na progressão do tumor (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Nas células saudáveis, a expressão de proto-oncogenes é rigorosamente regulada, não causando malignidade. Numa célula maligna, a progressão celular é parcialmente alterada, quando um ou mais proto-oncogenes, são mutados em oncogenes. Mutações que alterem a estrutura do DNA, a expressão de um gene, ou a quantidade dessa expressão, ativam o potencial oncogênico (LOURO, 2002).

Em contraste com o mecanismo de ativação dos proto-oncogenes, onde as mutações ativadoras são dominantes, as mutações inativadoras para a maioria dos genes supressores tumorais são recessivas: elas somente afetam a função destes genes quando os dois alelos do supressor estão inativados (KNUDSON, 2001). Na sua forma ativa, os genes supressores tumorais são expressos em níveis equivalentes em quase todos os tecidos diferenciados e desempenham papéis em diversas atividades celulares. Já é comprovado, também, que os genes supressores tumorais contribuem para a resistência a drogas em diversos tipos de tumores sólidos (LOURO, 2002).

Importante ressaltar novamente que outros eventos, a exemplo da epigenética, podem alterar o perfil de expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais e conseqüentemente desencadear uma neoplasia e/ou contribuir para a progressão tumoral (TABY; ISSA, 2010; MONTENEGRO et al., 2014).

2.3 TERAPIAS ALTERNATIVAS ANTICÂNCER

Apesar das diferentes abordagens para a terapia e prevenção do câncer, esta doença continua a ser uma das principais causas de morte no mundo. As terapias convencionais destinadas às células cancerosas, como quimioterapia ou radioterapia, também afetam as células saudáveis e muitas vezes falham na prevenção da metástase (AL-KHAMI et al., 2011). Procedimentos invasivos como cirurgias de ressecção, quando possíveis e indicados, são causas de desconfortos estéticos, possíveis distúrbios funcionais e, muitas vezes também apresentam uma eficácia limitada devido a problemas como metástase (BABAN et al., 2010; CAO; CRIPPS; WEY, 2010). Por esse motivo, novas terapias mais seletivas e menos agressivas são necessárias para o avanço no tratamento do câncer.

Dentro deste contexto, descobrir substâncias naturais que promovam alterações benéficas na expressão de genes comprovadamente envolvidos em processos tumorais (supressores tumorais e proto-oncogenes) sem que haja a necessidade do emprego de metodologias elaboradas para sua aplicação, se torna uma alternativa interessante a ser explorada.

2.4 INDOLINONAS

O termo indolinona compreende uma família de compostos policíclicos que frequentemente ocorrem em produtos naturais e são farmacologicamente importantes em muitas áreas terapêuticas (ZOU et al., 2011). Estes compostos são identificados como potentes inibidores de proteínas quinases, exibindo assim, efeitos promissores como fármaco anticâncer. Esta ação deve-se ao fato de que indolinonas são capazes de ligar-se ao sítio catalítico do ATP de receptores de tirosinas quinase, inibindo sua atividade (MOHAMMADI et al., 1997; SUN et al., 1998).

No contexto de crescimento tumoral, as indolinonas podem atuar diretamente sobre as células tumorais bloqueando seletivamente receptores de tirosinas quinase que conduzem a proliferação e sobrevivência das células tumorais, ou indiretamente, bloqueando a angiogênese (SHAWVER; SLAMON; ULLRICH, 2002; KIRKIN et al., 2004; ROTH et al., 2009; WALSANGIKAR; KULKARNI, 2013). As indolinonas também podem inibir quinases dependentes de ciclinas, moléculas envolvidas nos processos de controle do ciclo celular, transcrição, diferenciação celular, morte celular, entre muitos outros (KNOCKAERT; GREENGARD; MEIJER, 2002).

Muitos derivados de indolinona estão atualmente sobre investigação para aplicação no tratamento de inúmeras patologias, muitos das quais já com proteção intelectual e tecnologias patenteadas. Dentre estes, o Sunitinibe, foi o primeiro fármaco oral inibidor de proteínas quinases aprovado pela *US Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de carcinoma de células renais e tumores de estroma gastrointestinal resistentes a Imatinibe (ATKINS; JONES; KIRKPATRICK, 2006; PIETRAS; HANAHAN, 2005); além de evidências preliminares sugerirem melhora na eficácia terapêutica contra tumores sólidos avançados, quando combinado com outros quimioterápicos (HENG; KOLLMANNSBERGER, 2010; MOTZER et al., 2010; SWEENEY et al., 2010). Porém, Grünwald, Kalanovic e Merseburger (2010) identificaram efeitos adversos a exposição prolongada ao Sunitinibe, mostrando a necessidade de se encontrar novos derivados de indolinonas com melhor eficácia terapêutica e menos efeitos adversos.

Além da atividade anticâncer da indolinona, também foi relatado na literatura efeito contra esclerose múltipla (BOUERAT et al., 2005), HIV (BOECHAT et

al., 2007), doenças infecciosas (BOUCHIKHI et al., 2008), malária (KUMAR et al., 2011), entre outras.

2.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Para considerar um composto como um futuro medicamento é necessário que haja fundamentação experimental quanto à sua segurança e eficácia terapêutica. Nesse contexto, os testes de citotoxicidade são muito importantes para verificar a segurança e toxicidade da substância testada (MELO et al., 2000). Estes testes também são necessários para definir as concentrações a serem utilizadas em experimentos *in vitro* posteriores.

2.5.1 Ensaio de Hemólise

Este ensaio permite quantificar e avaliar os efeitos adversos de substâncias em geral sobre a membrana plasmática das hemácias. A consequente liberação da hemoglobina devido à perda da integridade da membrana (hemólise) pode ser quantificada por espectrofotometria, fornecendo parâmetros de caracterização dos efeitos destas substâncias *in vitro* (ROMANOWSKI; SCHUELLER, 1996). Além de ser uma técnica extremamente sensível, se faz ainda mais importante quando há intenção de introduzir o composto alvo de estudo diretamente na corrente sanguínea (LOVE et al., 2012).

2.5.2 Ensaio do MTT

Este ensaio é amplamente utilizado para determinação da citotoxicidade de compostos em culturas celulares. Neste ensaio, o sal de tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina – $C_{18}H_{16}N_5SBr$) é facilmente incorporado por células viáveis, onde é reduzido por desidrogenases, enzimas associadas com o retículo endoplasmático e a mitocôndria (SCHERLIESS, 2011). Evidências sugerem que a redução do MTT também pode ser mediada por NADH ou NADPH, no interior das células, porém fora das mitocôndrias (BERRIDGE; TAN, 1993; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

O método envolve a conversão, pelas células viáveis, do sal de MTT de coloração amarela em cristais de formazan, de coloração roxa. O teste do MTT é utilizado para determinação da atividade de compostos sobre a proliferação celular quando o tratamento é realizado em meio de cultura suplementado com soro bovino fetal. Quando o tratamento é realizado sem esta suplementação o ensaio é utilizado para determinação de sua citotoxicidade (MOSMANN, 1983).

A capacidade das células em reduzirem o MTT fornece uma indicação da integridade e atividade metabólica das células, que podem ser interpretadas como medidas da viabilidade celular (BERNHARD et al., 2003).

2.5.3 Ensaio de Exclusão pelo Azul de Tripán

O ensaio de exclusão pelo Azul de Tripán é um teste de citotoxicidade adequado para avaliar danos causados à membrana plasmática de células em cultura. A base do ensaio está na capacidade de células viáveis, com a membrana íntegra, não permitirem a entrada do corante vital Azul de Tripán. A internalização celular do corante é um indicativo de danos à membrana plasmática. Este teste é utilizado para quantificar a redução na porcentagem de células viáveis em uma suspensão e, conseqüentemente, o efeito citotóxico de uma determinada substância (FORNELLI; MINERVINI; LOGRIECO, 2004).

Este ensaio também é utilizado para validação dos experimentos, onde os tratamentos devem apresentar porcentagem de viabilidade celular acima de 80%.

2.6 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE – ENSAIO DO COMETA

Single cell gel electrophoresis, mais conhecido como ensaio do cometa, é uma técnica tradicionalmente usada para analisar e quantificar danos no DNA em células individuais, que pode ser realizada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (WENTZEL et al., 2010). O princípio básico do ensaio do cometa é a migração do DNA em gel de agarose pela técnica de eletroforese. Quando observada em microscópio, uma célula tem a aparência de um cometa, com uma cabeça (nucleoide) e uma cauda contendo fragmentos de DNA (HARTMANN et al., 2003). O nucleoide é uma estrutura semelhante a um núcleo, composto por alças

superenoveladas de DNA sem histonas, uma vez que durante a técnica estas proteínas são desnaturadas pelas altas concentrações de sais utilizadas. Assim, o nucleóide permanece aderido à matriz nuclear residual e quando o DNA é danificado, as alças presentes nesta estrutura se desenovelam e formam um halo, o qual pode migrar em direção ao polo positivo de acordo com a sua intensidade de dano (ÖSTLING; JOHANSON, 1984).

A detecção de quebras de fita simples de DNA em células individuais foi descrita pela primeira vez por Rydberg e Johanson (1978). Posteriormente Östling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver a técnica de eletroforese em microgel para detecção de danos no DNA. Nesta técnica, as células embebidas em agarose eram depositadas em uma lâmina de vidro para microscopia, lisadas por detergente ou sal, e o DNA livre migrava sob condições eletroforéticas neutras. Subsequentemente, Singh et al. (1988) introduziram uma técnica em microgel envolvendo eletroforese sob condições alcalinas ($\text{pH} > 13$), que oferece maior sensibilidade para detecção de danos no DNA, já que esta técnica desfaz as pontes de hidrogênio, permitindo detectar danos de fitas duplas, sítios alcali-lábeis e quebras de fita única.

O ensaio do cometa, diferentemente de ensaios de mutagenicidade, não detecta diretamente mutações, mas lesões genômicas geradas por agentes indutores de danos no DNA que ainda são passíveis de reparo. Dessa forma, o teste também pode ser empregado para estudos de reparo do DNA (VILLELA et al., 2003).

2.7 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

A técnica de transcrição reversa seguida da PCR em tempo real (RT-qPCR), uma variante da reação de PCR convencional, revolucionou os estudos de expressão gênica, e tem sido a principal tecnologia elucidatória da era pós-genômica, garantindo inúmeras vantagens sobre outras técnicas (DEEPAK et al., 2007; VANGUILDER et al., 2008).

A RT-qPCR possibilitou o estudo quantitativo da expressão de genes em várias áreas do conhecimento, como na medicina molecular, biotecnologia e microbiologia, sendo utilizada para o diagnóstico e monitoramento de biomarcadores. Tornou-se o método de escolha para caracterizar ou confirmar a expressão de um gene, validar experimentos de microarranjo, comparar níveis de

mRNA (RNA mensageiro) e miRNA (microRNAs) em diferentes amostras, e quantificar transcritos raros e pequenas alterações na expressão de genes, ou seja, a quantificação de RNA, onde quantidades limitadas destas moléculas estão disponíveis, sendo assim considerada de alto padrão para quantificação de RNA (DEEPAK et al., 2007; VANGUILDER et al., 2008).

2.8 GENES

2.8.1 MET (Hepatocyte Growth Factor Receptor)

O proto-oncogene *MET* está localizado no cromossomo 7 na região q31, sendo constituído por 21 éxons separados por 20 íntrons, que codificam um receptor de tirosina quinase transmembrana (ZORZETTO et al., 2012).

MET é normalmente expresso em tecidos epiteliais, enquanto seu ligante natural, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), é produzido por células mesenquimais. Em condições normais este gene é importante para vários eventos morfogênicos tanto na vida embrionária quanto adulta (MIGLIORE;GIORDANO, 2008; TRUSOLINO; BERTOTTI; COMOGLIO, 2010).

Quando ativado por HGF (*hepatocyte growth factor*), *MET* promove um programa genético conhecido como crescimento invasivo, que induz a célula a se desprender, migrar e invadir locais distantes (COMOGLIO; BOCCACCIO, 2001; FURGE; ZHANG; VANDEWOUDE, 2000). Sua ativação também fornece sinais de sobrevivência que impedem um processo de apoptose relacionado com a perda de adesão celular chamado de anoikis, sustentando assim, a colonização das células migratórias no seu novo local (STELLRECHT; GANDHI, 2009). Além disso, a sinalização de *MET* está envolvida com a angiogênese de tumores, tanto diretamente com a atividade pró-angiogênica de HGF que induz a formação de novos vasos e o brotamento dos pré-existentes, quanto indiretamente, por meio da regulação na secreção de fatores angiogênicos como o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (MIGLIORE; GIORDANO, 2008).

Em células tumorais, *MET* é constitutivamente ativo na maioria das vezes, desempenhando um papel crucial na tumorigênese e metástase. Sua alteração está associada com diferentes tipos de câncer, incluindo carcinomas,

sarcomas musculoesqueléticos, sarcomas de tecidos moles, leucemias e gliomas (BIRCHMEIER et al., 2003).

2.8.2 Gene *c-MYC* (*v-myc* Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog)

O proto-oncogene *c-MYC* se localiza na região cromossômica 8q24.21. O isolamento e a caracterização deste gene ocorreram em 1982, quando ele foi descrito como o homólogo celular das sequências transformantes do retrovírus aviário *viral avian myelocytomatosis (v-MYC)* (VENNSTROM et al., 1982).

c-MYC é um gene crítico para a homeostasia da célula quando normalmente expresso, tendo importantes papéis no crescimento, diferenciação e progressão do ciclo celular e indução da apoptose (FACCHINI; PENN, 1998). Sua participação na regulação do ciclo celular se dá por meio da promoção da passagem da fase G1 para a fase S, em decorrência da ativação do complexo ciclinas/CDK (ciclinas dependentes de quinases). Especula-se também que este gene seja responsável por inibir a transcrição de supressores tumorais, acarretando divisão celular descontrolada, não permitindo o eficiente reparo do material genético antes da replicação, ocasionando novas mutações e conseqüentemente, o surgimento de instabilidade genética (FARIA; RABENHORST, 2006).

A maioria dos tipos de câncer humano manifesta expressão aberrante de *c-MYC* em alta frequência, além de muitas vezes também ocorrer sua amplificação. Vários estudos demonstraram que *c-MYC* possui potencial oncogênico que pode ser reforçado por colaboração com outros oncogenes, como o *Ras*, ou com estímulos de crescimento extracelular que ativam *Ras*, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) (WANG; LISANTI; LIAO, 2011).

2.8.3 Genes *CCND1* (Cyclin D1) e *CDK4* (Cyclin-dependent kinase 4)

O ciclo celular é um mecanismo altamente regulado subdividido em quatro fases distintas: duas fases *gap* G1 e G2, separando a S, de síntese de DNA, da fase M, de mitose. A progressão através de cada fase do ciclo celular é regida por complexos formados entre as ciclinas, e suas subunidades catalíticas CDKs. A passagem pela fase G1 é iniciada por um estímulo mitogênico, o qual inicia a

expressão e união das ciclinas D (D1, D2 e D3) com as suas respectivas subunidades catalíticas CDK4 e CDK6 (BENZENO et al., 2006).

Em células de mamíferos, os complexos formados entre as ciclinas D e as CDKs, principalmente CDK4 e CDK6, regulam a fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), que por sua vez regula a família E2F de proteínas que estão relacionadas com o controle e progressão do ciclo celular (REED, 1997). A ativação inapropriada dos complexos ciclina D/CDK4 é um evento comum em neoplasias malignas humanas (YU et al., 2003).

O gene *CCND1* é um proto-oncogene que está localizado na região cromossômica 11q13.3 e representa o segundo locus mais frequentemente amplificado no genoma do câncer humano (BEROUKHIM et al., 2010). Translocações ou ampliações do gene *CCND1* resultam em sua super expressão, alterando a progressão do ciclo celular e colaborando para o surgimento de uma variedade de neoplasias (SHAN; ZHAO; GU, 2009). Além de sua função na progressão do ciclo celular, Jirawatnotai et al. (2012) identificaram que a proteína CCND1 também desempenha um importante papel no processo de reparo de danos no DNA.

O gene *CDK4* localizado na região q14.1 do cromossomo 12 é um proto-oncogene que controla o início da fase G1 do ciclo celular. A inibição de *CDK4* pela perda de heterozigidade de *p16* ou silenciamento do gene é um achado comum nas neoplasias humanas e contribui para a predisposição hereditária ao melanoma (YU et al., 2003).

Bachmann et al. (2004) realizaram um estudo em que verificaram expressão de *CDK4* relacionada à redução na taxa de sobrevivência de pacientes com melanoma, correlacionando a expressão desse gene às fases mais avançadas de tumores primários.

2.8.4 Gene *CDKN2A* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

O gene *CDKN2A* localizado na região cromossômica 9p21.3, composto por quatro éxons, codifica duas proteínas de ação supressiva tumoral e apoptótica que estão envolvidas no controle do ciclo celular (KIM; SHARPLESS, 2006). A codificação das proteínas ocorre a partir de duas vias distintas de

transcrição e dois promotores diferentes: a transcrição alfa e a transcrição beta (RUAS; PETERS, 1998).

A transcrição alfa codifica a proteína p16^{INK4A}, ou p16, que é composta por 156 aminoácidos. A p16 liga-se às CDKs CDK4 e CDK6 inibindo sua ligação com a ciclina D e, conseqüentemente, prevenindo a formação dos complexos CDK/ciclina D. Desta forma, p16 desempenha seu papel supressor tumoral, regulando negativamente o crescimento celular, retendo as células tumorais na fase G1 e impedindo sua progressão para a fase S (RUAS; PETERS, 1998).

O produto alternativo obtido a partir da via de transcrição beta é a proteína p14^{ARF} (*alternative reading frame*). A proteína p14 inibe a progressão do ciclo celular pelo seu efeito regulatório na proteína p53. No seu processo fisiológico, a p14 inibe a ação da proteína HDM2 (*human double minute 2*) que agiria marcando proteínas com a ubiquitina, com o intuito de degradá-las pela ação de proteossomas. No caso das mutações de *CDKN2A*, a inibição de HDM2 por p14 não ocorre, permitindo a ubiquitinação e conseqüente degradação da proteína supressora tumoral p53 pela ação proteossômica (RUAS; PETERS, 1998).

O gene *CDKN2A* é alvo de muitos estudos, pois tem se mostrado alterado em diversos tipos de tumores humanos. Alterações podem ocorrer devido a deleções, mutações na região codificadora ou ainda metilação da região promotora (KOHNO; YOKOTA, 2006).

2.8.5 Gene CCNA2 (Cyclin A2)

A ciclina A é um componente necessário para o início da síntese de DNA durante a fase S e para a entrada na mitose. Existem dois subtipos de ciclina A: a ciclina A1, cuja expressão está restrita a poucos tecidos, como por exemplo, aos testículos e linhagens leucêmicas; e a ciclina A2, que é expressa em quase todos os tecidos (YANG; MOROSETTI; KOEFFLER, 1997).

As células tumorais são caracterizadas pela desregulação dos *checkpoints* do ciclo celular, levando a divisão e proliferação celular descontroladas. Isso pode ser causado pelo aumento de expressão das ciclinas ou ativação anormal das CDKs. Os níveis das ciclinas variam de maneira cíclica durante o ciclo celular para ativar as CDKs específicas, exigidas para a progressão adequada do ciclo celular (HARTWELL; KASTAN, 1994).

O gene *CCNA2*, localizado na região cromossômica 4q27, é super expresso em uma variedade de cânceres humanos se comparado com células saudáveis. Evidências indicam que a expressão desregulada da ciclina A2 está fortemente associada à instabilidade cromossômica, transformação neoplásica e proliferação tumoral (BUI et al., 1993). Além disso, o seu nível de expressão em diversos tipos de câncer parece ser de valor prognóstico, tais como previsão de sobrevivência, agressividade ou recidiva precoce (VOLM et al., 1997).

2.8.6 Gene E2F1 (E2F transcription fator 1)

A família *E2F* é composta por oito genes (*E2F1-8*) e nove proteínas que, de uma forma geral, podem ser classificadas como ativadoras ou repressoras da transcrição (KONG et al., 2007). Os membros E2F1-6 necessitam se dimerizar com outra proteína, DP1, DP2, DP3 ou DP4 (*dimerization partners proteins*), a fim de formar fatores de transcrição funcionais que vão se ligar ao DNA com elevada afinidade (MINATO, 2008); já E2F7 e 8 tem um domínio próprio de ligação ao DNA, não precisando se ligar a proteína DP (TANEJA, 2008). Os fatores de transcrição dessa família estão fortemente ligados à regulação do ciclo celular e a proliferação das células, controlando a expressão de genes essenciais para a transição da fase G1 para S e iniciação da replicação do DNA (CHEN; TSAI; LEONE, 2009).

Dentre os membros da família *E2F*, o mais bem estudado e caracterizado até o momento é o fator de transcrição *E2F1*, localizado no cromossomo 20q11.2. A proteína E2F1 codificada por este gene tem uma íntima associação com a proteína supressora tumoral Rb, que quando fosforilada permite a liberação e ativação de E2F1 (WONG et al., 2011).

A superexpressão de *E2F1* é um evento comum em um grande número de tumores malignos (DYSON, 1998). Um dos fatores que contribuem para esta superexpressão é o aumento exacerbado na fosforilação de Rb ou ausência desta, induzindo à liberação de E2F1 (HALABAN, 2005).

2.8.7 Gene BIRC5 (Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 5)

Os genes da família *IAP* codificam proteínas regulatórias que desempenham papel fundamental na célula, tal como inibição de apoptose e

progressão do ciclo celular (HOLCIK, 2002). Dentre estes, o gene *BIRC5*, situado no cromossomo 17, região q25.3, codifica a proteína survivina, constituída por 142 aminoácidos. Este gene é altamente expresso em células cancerosas e tecido fetal, porém raramente expresso em tecidos normais diferenciados (MITA et al., 2008).

BIRC5 age como um antagonista da morte celular por apoptose por meio da inibição de caspases, formando um complexo com a proteína inibidora de apoptose ligada ao X (XIAP – *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (DOHI et al., 2004). Sua proteína também desempenha um papel chave na fase G2/M do ciclo celular e pode fazer com que células tumorais ignorem o *checkpoint* G2/M promovendo assim uma proliferação celular exacerbada (TAMM et al., 1998).

A expressão aumentada de *BIRC5* é um marcador de prognóstico desfavorável, correlacionado com a diminuição de sobrevida em diferentes tipos de câncer, como de pulmão, fígado, câncer colorretal e câncer gástrico (KRIEG et al., 2013; SONG et al., 2013). Devido a sua grande diferença de expressão entre tecidos neoplásicos e saudáveis e sua capacidade de inibir a apoptose e regular o ciclo celular, *BIRC5* se torna um alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de neoplasias malignas.

2.8.8 Genes BAX (B-cell lymphoma 2-associated X protein) e BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large)

A apoptose, forma principal e mais estudada de morte celular programada, desempenha um papel central na homeostase dos tecidos durante o desenvolvimento e também toda vida dos organismos multicelulares (MCCONKEY; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 1996). Alterações na apoptose são frequentemente relacionadas a processos de tumorigênese (HICKMAN, 2002).

Dentre os inúmeros reguladores do processo de morte nas células, os genes da família *BCL-2* são um dos mais importantes na via intrínseca, ou mitocondrial, da apoptose. Dentro desta família há os inibidores de apoptose, onde faz parte o gene *BCL-XL*, e os promotores de apoptose, onde participa o gene *BAX* (CHAN; YU, 2004).

O gene *BAX* foi identificado em 1993 como um gene pró-apoptótico que está localizado na região q13.3-q13.4 do braço longo do cromossomo 19 (OLTVAI; MILLIMAN; KORSMEYER, 1993). A proteína codificada por *BAX* se situa

no citoplasma de células saudáveis, e sofre translocação para a membrana externa da mitocôndria mediante a indução de apoptose, onde esta causa liberação do citocromo c do espaço intermembrana, e conseqüentemente, disfunções mitocondriais (WEI et al., 2001).

Já *BCL-XL* é um gene anti-apoptótico que se encontra no braço longo do cromossomo 20, na região q11.21, sendo abundantemente expresso em células neuronais adultas e também em diversos tipos tumorais (KARBOWSKI et al., 2002). A proteína codificada por *BCL-XL* se encontra na membrana interna da mitocôndria e é necessária para evitar grandes alterações em seu potencial de membrana. Este gene também apresenta funções adicionais não-apoptóticas, incluindo papéis na dinâmica mitocondrial, metabolismo celular e atividade neuronal (CHEN et al., 2011; YI et al., 2011).

2.8.9 Gene TP53 (Tumor protein P53)

O gene *TP53*, localizado na região cromossômica p13.1 do cromossomo 17, é um supressor tumoral que possui papel crucial na manutenção da estabilidade genética e na prevenção da formação do câncer (SURGET; KHOURY; BOURDON, 2014). Este gene codifica a proteína p53 que é ativada em resposta a alterações na homeostase da célula, como por exemplo, danos ao DNA, aberrações cromossômicas, encurtamento de telômeros, insuficiência nutricional, choque térmico, infecção viral, alterações de pH, hipóxia e ativação de oncogenes (OREN, 2003).

Sobre condições fisiológicas normais, a proteína p53 se mantém em baixos níveis intracelulares devido ao seu regulador negativo, a ubiquitina-ligase E3 HDM2, que causa uma degradação dependente de ubiquitinação por meio de proteossomas. Em resposta a uma variedade de estresses celulares, a interação p53-HDM2 é interrompida e os níveis de p53 aumentam (HORN; VOUSDEN, 2007). Conseqüentemente esta pode ativar ou reprimir a transcrição de genes envolvidos na regulação das principais respostas celulares ao stress, tais como a parada de ciclo celular, reparo de DNA, senescência, apoptose, entre outros (HORN; VOUSDEN, 2007; LI et al., 2012).

Mutações no gene *TP53* são comuns em grande parte dos cânceres humanos, proporcionando vantagem ao crescimento neoplásico. Porém, um grande

número de tumores humanos mantém o alelo selvagem de *TP53*, apesar de muitos deles apresentarem evidências de perda de função e perturbações das vias de ativação de p53 em resposta ao stress (HORN; VOUSDEN, 2007). Estas vias apresentam alvos atraentes para o desenvolvimento de tratamentos que possam restaurar a função da proteína p53 nestes tumores, como por exemplo, drogas que inibem a interação entre p53 e MDM2, tal como Nutlin-3 (VASSILEV et al., 2004), ou que alterem a expressão deste gene de forma benéfica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* de uma nova indolin-3-ona, isolada de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV, e seus efeitos na expressão de genes envolvidos em processos de carcinogênese.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a citotoxicidade da indolin-3-ona em eritrócitos humanos por meio do ensaio de hemólise, e em células de hepatocarcinoma humano (linhagem HepG2) por meio do ensaio do MTT, além de seu efeito sobre a proliferação celular, em diferentes concentrações e tempos de tratamento, e a partir destes, definir as concentrações a serem utilizadas nos ensaios subsequentes.

Avaliar o potencial genotóxico da indolin-3-ona, por meio do ensaio do cometa em células HepG2 em 24 horas de tratamento (APÊNDICE A).

Analisar por PCR em tempo real o perfil de transcrição de genes envolvidos em processos de carcinogênese na linhagem celular HepG2 tratada e não tratada com indolin-3-ona nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento.

4 ARTIGO

**MODULAÇÃO DE PROTO-ONCOGENES E INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS HEPG2 POR UMA NOVA INDOLIN-3-ONA PRODUZIDA PELA
LINHAGEM LV DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.**

Lucas Milanez Benicio¹, Mayara Milek Stanganelli¹, Ane Stefano Simionato¹, Cláudio Roberto Novello², Ivânia Terezinha Albrecht Schuque², João Carlos Palazzo de Mello², Mário Sérgio Mantovani¹, Galdino Andrade Filho¹, Ilce Mara de Syllos Colus¹, Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior¹ e Marcelo Tempesta de Oliveira¹.

Endereço para correspondência: Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid PR 445, Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP 86051-980, Londrina, Paraná, Brazil.

Artigo a ser submetido à revista *Journal of Medicinal Chemistry*
ISSN: 0022-2623 (impressa) / 1520-4804 (online)
Fator de impacto: 5.614

¹ Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86057-970, Londrina – PR, Brasil

² Universidade Estadual de Maringá, CEP: 87020-900, Maringá – PR, Brasil

RESUMO:

Amplamente conhecidos por apresentarem diversas propriedades farmacológicas, os compostos derivados de indolinona, encontrados em meios naturais distintos, são de grande interesse para a pesquisa médica. Este estudo teve como objetivo a produção, purificação e identificação de um derivado de indolinona, assim como a avaliação *in vitro* de seu potencial anticâncer. Utilizando a cepa LV de *Pseudomonas aeruginosa* para obtenção de metabólitos secundários bioativos, foi possível purificar e identificar um derivado de indolinona com provável ineditismo (em patente). Foi observado que os efeitos citotóxicos e antiproliferativos da indolin-3-ona sobre a linhagem celular HepG2 foram dose-tempo-dependentes, se intensificando de acordo com a variável em questão. Foi possível observar também, que a indolin-3-ona modulou a expressão de genes-chaves envolvidos no processo de carcinogênese (*MET*, *c-MYC*, *CDKN2A*, *CDK4*, *CCND1*, *CCNA2*, *E2F1*, *BIRC5*, *BAX*, *BCL-XL* e *TP53*), reprimindo a expressão gênica, principalmente de proto-oncogenes, e também se intensificando de forma dose-tempo-dependente. O ineditismo da molécula e a provável atividade anticâncer observada evidenciam o potencial deste composto.

INTRODUÇÃO

O termo indolinona compreende uma família de compostos farmacologicamente importantes em muitas áreas terapêuticas, entre elas, ativos analgésicos,¹ atividade antiviral,² anti-inflamatória,³ antibacteriana, antiprotozoária,⁴ para o tratamento de doenças imunológicas, cardiovasculares,⁵ diabetes, doença renal, artrite e antineoplásica^{6,7} as quais geralmente estão relacionadas a um transtorno em proteínas quinase de um organismo, agindo direta ou indiretamente na proliferação celular anormal.^{8,9} Dentro do contexto antineoplásico, as indolinonas podem atuar diretamente sobre as células tumorais bloqueando seletivamente receptores de tirosinas quinase que conduzem a proliferação e sobrevivência das células tumorais, ou indiretamente, bloqueando a angiogênese.¹⁰⁻¹³ Estas moléculas também podem inibir quinases dependentes de ciclinas, proteínas envolvidas nos processos de controle do ciclo celular, transcrição, diferenciação celular, morte celular, entre outros.¹⁴

Diferentes moléculas do grupo das indolinonas vêm sendo pesquisadas, geralmente sintetizadas, com o intuito de buscar alternativas como atuantes na inibição de proteínas quinases associadas a atividades anormais das células, muitas dessas moléculas já com tecnologias patenteadas.¹⁵ Já foram descritos a atuação de derivados de indolinonas nos receptores MET,¹⁶ VEGF, FGF (*fibroblast growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*),¹² c-Kit (*v-Kit hardy-*

zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog), entre outros,^{6,17} podendo também apresentar inibição multi-quinase, quando atua em vários receptores simultaneamente.^{18,19}

A principal busca em todos os ativos anticâncer é atingir as células tumorais sem consequências para as células saudáveis, sendo mais eficazes e minimizando efeitos secundários ao tratamento, com a finalidade de ao menos controlar a doença sem afetar a qualidade de vida dos pacientes. Esta característica desafia a pesquisa de maneira geral, já que as células cancerosas usam várias estratégias de sobrevivência, crescimento e disseminação pelo organismo.⁹ Desta forma, este estudo teve como objetivo a produção, purificação e identificação do derivado de indolinona produzido pelo metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV, assim como a avaliação do potencial anticâncer desta molécula.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Química

Todo processo de produção, isolamento e identificação do composto alvo deste estudo é correspondente ao Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Mayara Milek Stanganelli, apresentada ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, sob a orientação do Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior. Os dados serão incorporados ao presente artigo apenas em sua versão final.

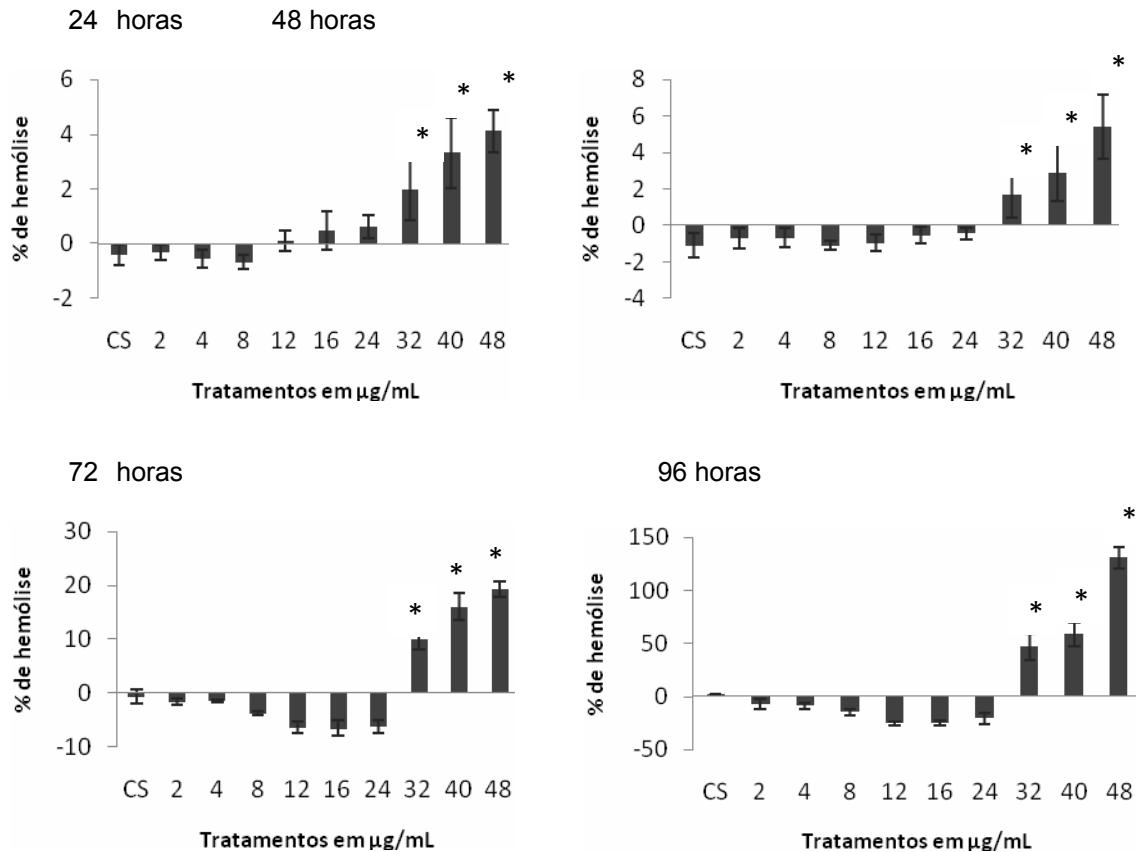
O bioproduto produzido pelo metabolismo secundário de *P. aeruginosa* cepa LV, foi purificado, identificado e considerado uma molécula inédita, não sendo encontrada descrição na literatura sobre a proposta molecular encontrada. Quando comparado com outras indolinonas naturais ou semi-sintéticas, várias diferenças podem ser atribuídas, principalmente a unidade indole, que neste estudo foi de indolin-3-ona, enquanto que, a maioria das indolinonas naturais patenteadas possuem uma unidade indolin-2-ona.²⁰

Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de hemólise avaliou a citotoxicidade da indolin-3-ona em eritrócitos humanos através da quantificação por espectrofotometria da hemoglobina, liberada por meio de danos causados sobre a membrana plasmática. A figura 1 mostra os resultados obtidos neste ensaio e é possível observar que concentrações até 24 µg/mL de indolin-3-ona não causam danos físicos à membrana dos eritrócitos em nenhum tempo de exposição, sendo observado efeito citotóxico apenas a partir da concentração de 32 µg/mL. Vale ressaltar ainda que nos tempos de 24 e 48 horas a porcentagem de hemólise não ultrapassou 10%, parâmetro utilizado por Fischer et al. (2003)²¹ para indicar citotoxicidade.

A realização do ensaio de viabilidade celular pela exclusão do Azul de Tripán mostrou que as concentrações 8, 16 e 24 µg/mL apresentaram viabilidade superior a 90%, ou seja, não interferiram na integridade da membrana plasmática das células HepG2, corroborando com os resultados do ensaio de hemólise.

Figura 1 – Porcentagem de hemólise observada em eritrócitos humanos nos tratamentos com nove concentrações de indolin-3-ona por 24, 48, 72 e 96 horas no ensaio de hemólise. *Estatisticamente diferente do CS ao $p < 0.05$. ANOVA seguida de Dunnet. CS = controle de solvente, <1% de metanol.



No ensaio do MTT a redução do sal de tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina – $C_{18}H_{16}N_5SBr$) por meio de enzimas desidrogenases de células viáveis²² fornece uma indicação da integridade e atividade metabólica das células, que são interpretadas como medidas da viabilidade celular.²³

O tratamento para o ensaio do MTT foi realizado de duas formas: primeiramente na ausência de soro bovino fetal, para avaliar o efeito citotóxico da indolin-3-ona sobre as células, e posteriormente suplementado com soro bovino fetal, que avalia a capacidade de interferência da indolin-3-ona sobre a proliferação das células HepG2, mensurando em ambos os casos a atividade do metabolismo energético da célula.

O ensaio de MTT na ausência de soro bovino fetal mostrou que nos tempos de 24 e 48 horas, a indolin-3-ona foi citotóxica (diminuição da atividade metabólica) a partir da concentração de 24 µg/mL, no tempo de 72 horas a partir de 16 µg/mL e no tempo de 96 horas a partir de 12µg/mL(Figura 2).

O ensaio de MTT em presença de soro bovino fetal mostrou que no tempo de 24 horas, as concentrações a partir de 16 µg/mL de indolin-3-onainterferiram na proliferação das células HepG2, e já nos tempos de 72 e 96 horas isto foi observado a partir das concentrações de 8 e 2µg/mL, respectivamente (Figura 3).

A análise de regressão dos dados do ensaio do MTT com soro bovino fetal mostrou alta precisão experimental nos tempos de 24, 72 e 96 horas, considerando que os coeficientes de variação foram de 4,77%, 4,12% e 5,59%, respectivamente. Para o tempo de 24 horas o melhor modelo de regressão ajustado aos dados foi o linear e, de acordo com a função obtida, um aumento de 1 µg/mL na concentração de indolin-3-ona diminui 0,53% da viabilidade celular. Este modelo explica 80,78% da viabilidade celular encontrada. Para os tempos de 72 e 96 horas, o melhor modelo de regressão foi o quadrático. As funções obtidas explicam 95,59% da viabilidade celular encontrada no tempo de 72 horas e 94,95% da viabilidade do tempo de 96 horas. A concentração de indolin-3-ona para atingir a mínima viabilidade celular no tempo de 72 horas, neste caso 63,24%, é de 41,79 µg/mL. Para o tempo de 96 horas, a concentração de 58,87 µg/mL é necessária para atingir a viabilidade mínima de 39,74%.

As células HepG2 se mostraram mais sensíveis à indolin-3-ona quando mensurada sua ação sobre a proliferação celular, porém, em ambos os ensaios do MTT,este composto mostrou um efeito dose-tempo-dependente sobre as células.

Tanto o ensaio de hemólise quanto o ensaio do MTT avaliam citotoxicidade, porém o primeiro se baseia na integridade da membrana plasmática, enquanto o segundo leva em consideração a atividade metabólica da célula. Como os ensaios se baseiam em diferentes parâmetros para avaliar a citotoxicidade, pode-se dizer que a indolin-3-onaé citotóxica para a atividade metabólica da célulaem concentrações a partir de 16 µg/mL para tratamento de 24 horas, porém nestas mesmas condiçõesnão interfere na integridade da membrana celular, mostrando

capacidade de lisar a célula apenas a partir de concentrações maiores que 32 $\mu\text{g/mL}$.

A literatura já relata atividade antiproliferativa de outros compostos do grupo das indolinonas em uma variedade de linhagens tumorais humanas, como de próstata (linhagens PC-3 e DU-145),^{7,24} pulmão (A549 e H526),^{7,17} cólon e reto (HCT-116), linhagens leucêmicas (K652 e HL-60) e até mesmo na linhagem de fígado HepG2, utilizada neste estudo.⁷ Em contraste, não foi encontrada atividade antiproliferativa de indolinonas na linhagem celular não-tumoral de fígado humano QSG-7701, mostrando efeito seletivo para linhagens tumorais, fazendo com que aumente ainda mais o interesse nas propriedades anticâncer dessas moléculas.⁷

Figura 2 – Viabilidade (%) observada para células HepG2 nos tratamentos com nove concentrações de indolin-3-ona no ensaio do MTT para avaliação citotoxicidade (sem soro bovino fetal). Os resultados são expressos como uma porcentagem em relação ao controle negativo (CN). *Estatisticamente diferente do CS ao $p < 0.05$. ANOVA seguida de Dunnet. CN = controle negativo, PBS (tampão fosfato salino); CS = controle de solvente, $< 1\%$ de metanol.

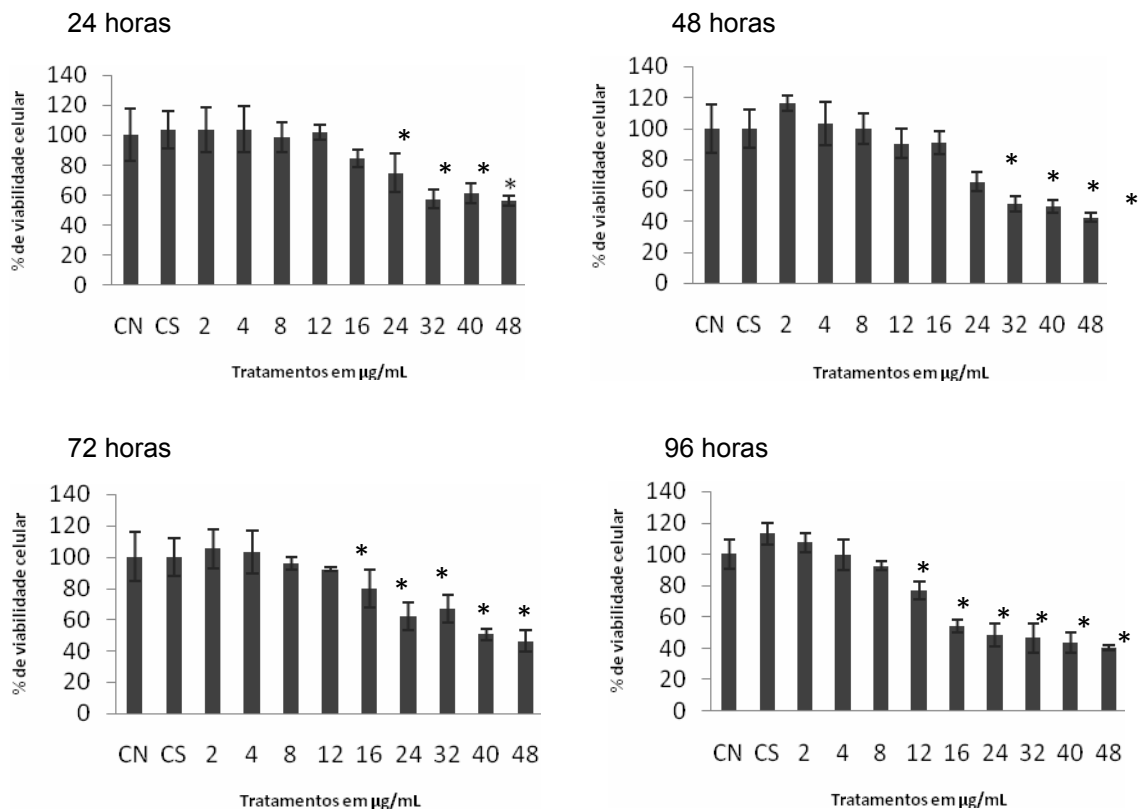
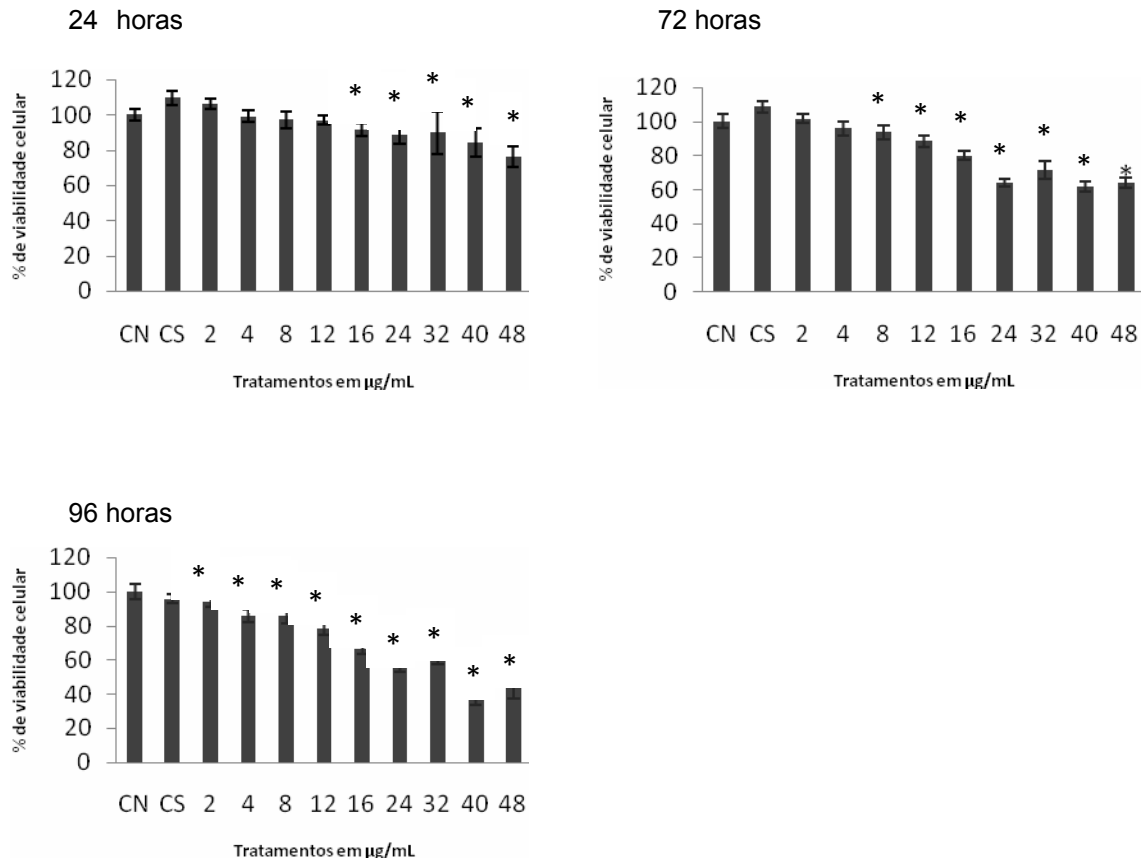


Figura 3 – Viabilidade (%) observada para células HepG2 nos tratamentos com nove concentrações de indolin-3-ona no ensaio do MTT para avaliação da proliferação celular (com soro bovino fetal). Os resultados são expressos como uma porcentagem em relação ao controle negativo (CN). *Estatisticamente diferente do CS ao $p < 0.05$. ANOVA seguida de Dunnet. CN = controle negativo, PBS (tampão fosfato salino); CS = controle de solvente, <1% de metanol.



Quantificação de mRNA por RT-qPCR

Devido aos diversos trabalhos científicos relatando os efeitos das indolinonas contra o câncer, foram selecionados genes envolvidos direta ou indiretamente no processo de carcinogênese para serem avaliados quanto a sua alteração na expressão após o tratamento com indolin-3-ona: os proto-oncogenes *MET*, *c-MYC*, *CCND1* e *CDK4*, os supressores tumorais *CDKN2A* e *TP53*, além de genes envolvidos nos processos de ciclo celular *CCNA2* e *E2F1* e de apoptose, *BAX*, *BCL-XL* e *BIRC5*. Para a realização dos testes de expressão gênica foram definidas as concentrações de 8, 16 e 24 µg/mL de indolin-3-ona.

A partir da realização da RT-qPCR foi possível observar que a indolin-3-ona reprimiu a expressão gênica, principalmente de proto-oncogenes,

diminuição esta que também se intensifica de forma dose-tempo-dependente (Figuras 5 e 6), assim como observada na proliferação celular avaliada pelos ensaios de MTT.

As análises de expressão gênica revelaram que para o tempo de tratamento de 24 horas, os genes *MET*, *c-MYC*, *CDKN2A*, *BAX* e *BCL-XL* tiveram sua expressão induzida em relação ao controle negativo na condição de tratamento com 8 µg/mL de indolin-3-ona. Já os genes *CCND1*, *E2F1*, *BIRC5*, *TP53* e também *MET*, *c-MYC* e *BCL-XL* tiveram sua expressão reprimida na condição de tratamento com 24 µg/mL de indolin-3-ona (Figura 5).

Para o tempo de tratamento de 48 horas os genes *BAX*, *CCND1*, *BCL-XL*, *BIRC5*, *CDK4*, *MET*, *c-MYC*, *CCNA2* e *TP53* tiveram sua expressão reprimida quando comparados ao controle negativo na condição de tratamento de 24 µg/mL. Os genes *BAX*, *CCND1* e *BCL-XL* apresentaram repressão em sua expressão já a partir da condição de tratamento de 16 µg/mL. *E2F1* foi o único gene com expressão induzida nas concentrações de 8 µg/mL e 16 µg/mL (Figura 6).

Figura 5 – Quantificação relativa dos genes *MET*, *c-MYC*, *CDK4*, *CDKN2A*, *CCND1*, *CCNA2*, *E2F1*, *BIRC5*, *BAX*, *BCL-XL* e *TP53* em células HepG2 tratados por 24 horas com indolin-3-ona nas concentrações de 8, 16 e 24 µg/mL. *Estatisticamente diferente do controle negativo com $p \leq 0,01$ e **com alteração na expressão maior que duas vezes com $p \leq 0,05$.

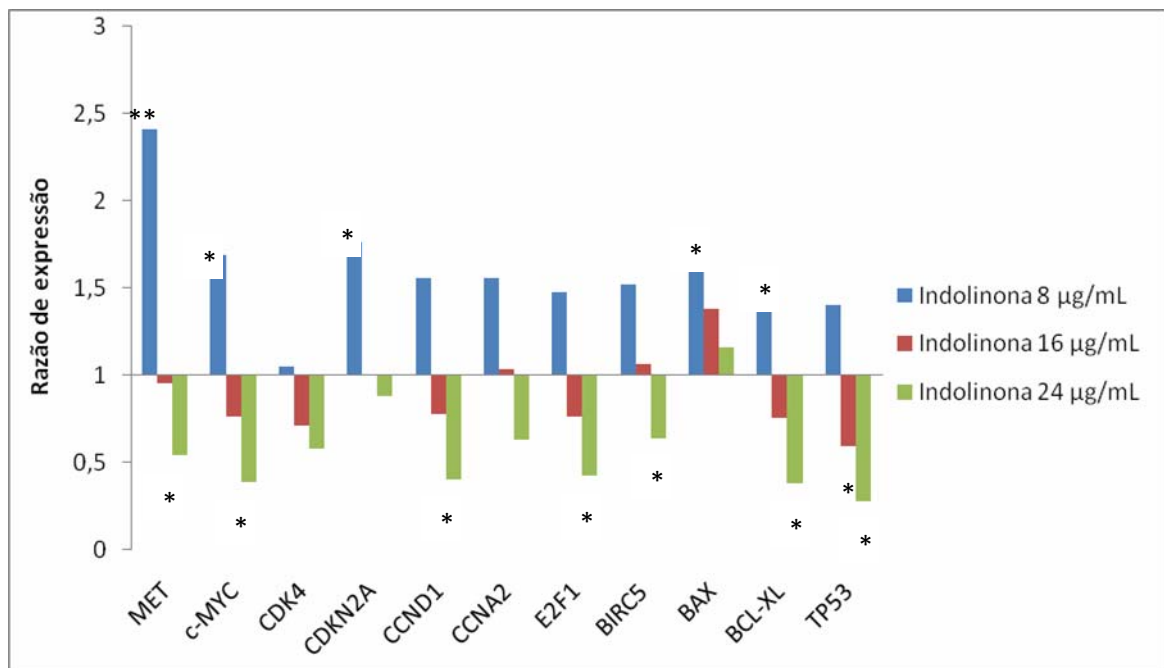
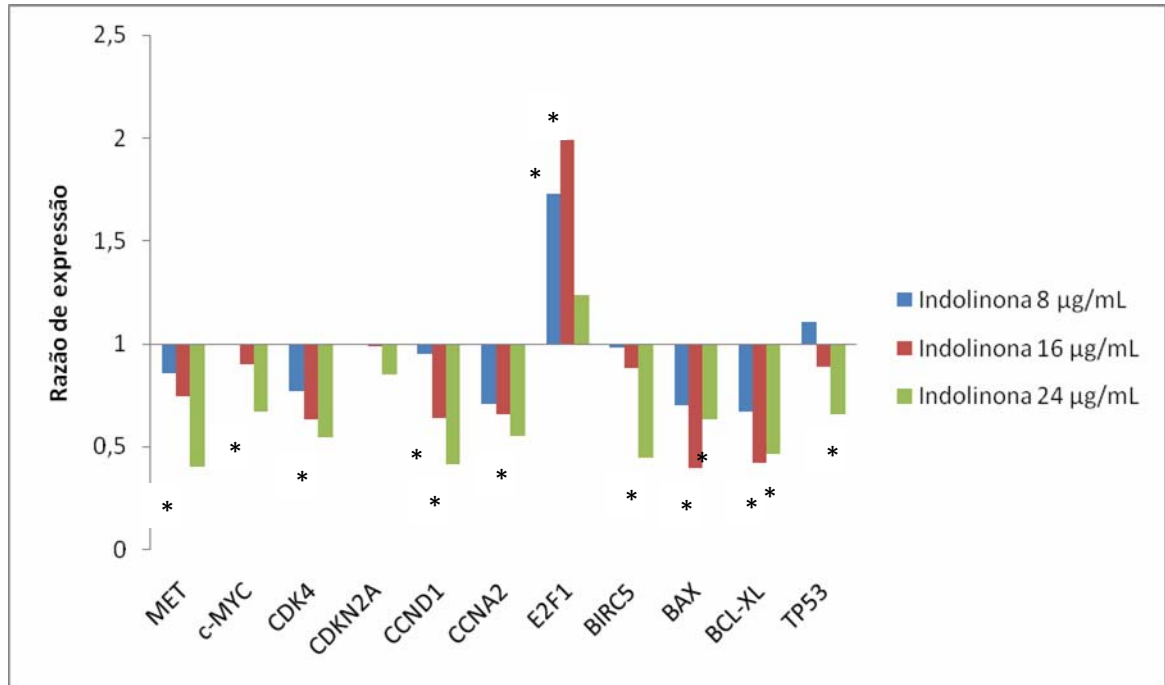


Figura 6 – Quantificação relativa dos genes *MET*, *c-MYC*, *CDK4*, *CDKN2A*, *CCND1*, *CCNA2*, *E2F1*, *BIRC5*, *BAX*, *BCL-XL* e *TP53* em células HepG2 tratados por 48 horas com indolin-3-ona nas concentrações de 8, 16 e 24 µg/mL. *Estatisticamente diferente do controle negativo com $p \leq 0,01$.



O gene *MET* tem sua expressão elevada quando comparado a tecidos saudáveis em uma variedade de cânceres. Sua ligação com o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) desencadeia uma cascata de reações que resulta em um grande número de respostas biológicas que contribuem para a tumorigênese.²⁵ Por esta razão, várias abordagens para bloquear a ativação de *MET* estão em desenvolvimento, tais como moléculas inibidoras de tirosinas quinases.²⁶

O tratamento com a menor concentração de indolin-3-onano tempo de 24 horas leva a uma resposta adaptativa inicial da célula em seu primeiro ciclo de divisão, onde foi detectado aumento na expressão de *MET*, situação não observada no tempo de 48 horas. Porém, sua administração em concentrações mais altas, as quais reprimiram sua expressão, manteria *MET* inativado, fazendo com que a célula não se tornasse maligna por esta via de ativação. Já existem abordagens com *MET* como alvo na prática clínica e em fases pré-clínicas de estudo, dentre elas o uso de moléculas antagônicas, anticorpos, inibidores de proteínas quinases e as que reduzem a sua expressão,²⁷ no qual entraria a molécula utilizada no presente estudo.

c-MYC mostrou resposta semelhante a *MET*. Sua super expressão leva a célula a necessitar de níveis reduzidos de fatores de crescimento, conseqüentemente a uma fase G1 do ciclo celular encurtada, enquanto que sua expressão reduzida provoca uma maior duração do ciclo celular.²⁸ Assim, o tratamento com a maior concentração de indolin-3-ona, que inibiu sua expressão nos dois tempos de tratamento, contribuiria para um ciclo celular mais demorado, conseqüentemente para uma menor proliferação das células, interessante para o tratamento de células tumorais.

O potencial oncogênico de *c-MYC* pode ser aumentado se ocorrer em colaboração com outros oncogenes, tal como *Ras*,²⁹ sendo assim, a inibição de sua expressão pode colaborar, também, para que outras vias de malignização da célula não ocorram.

O gene *CCND1* apresentou o mesmo comportamento de expressão que os genes *MET* e *c-MYC*. Outros genes correlatos como, *CDK4* e *CCNA2* apesar de não terem sua expressão significativamente alterada no tratamento de 24 horas, também apresentaram o mesmo padrão de expressão, de redução dose-dependente. Já no tratamento de 48 horas a expressão de *CDK4* e *CCNA2* foi modulada negativamente na terceira condição de tratamento.

CCND1 e *CDK4* formam um complexo que junto com outras proteínas, como a supressora tumoral Rb e o fator de transcrição E2F1, controlam a progressão do ciclo celular em condições normais. A proteína Rb, quando hipofosforilada, permanece ativa, levando a um checkpoint tardio da fase G1 pela ligação e repressão a E2F1. Em resposta a estímulos mitogênicos o complexo *CCND1/CDK4* fosforila a proteína Rb, a inativando e permitindo que transcrições, dependentes de E2F1, de genes necessários para entrada na fase S, ocorram.³⁰ Sendo assim, a super expressão dos genes *CCND1* e *CDK4* favorece a estimulação da divisão celular, o que mostra que o tratamento com a maior concentração de indolin-3-ona, que inibiu a expressão desses genes e, conseqüentemente, a formação do complexo *CCND1/CDK4*, manteria os níveis normais de fosforilação de Rb, fazendo com que esta realize a sua atividade supressora tumoral. Ainda neste contexto, a repressão na expressão de *E2F1* (observada na maior concentração de tratamento por 24 horas) contribui para uma não aceleração do ciclo celular, visto que este não ativaria a transcrição de genes importantes para a entrada na fase S do ciclo celular. *E2F1* se comportou como os

demais genes no tempo de 24 horas,entretanto, demonstrou um comportamento diferente no tempo de 48 horas,tendo sua expressão modulada positivamente nas duas primeiras concentrações de tratamento.

Analisando a multiplicidade de vias de morte desencadeadas por *E2F1*, não há dúvida de que a sua função supressora de tumor é profundamente ligada ao eixo Rb/E2F. Em adição, uma grande quantidade de evidências indica que *E2F1*, assim como *TP53*, também induz apoptose em células expostas a tratamentos genotóxicos, atuando, assim, como parte de um mecanismo antitumorigênico a prova de falhas que é fundamental para proteger o organismo de transformação maligna e reprimir a formação de tumores.^{31,32} Este fato poderia explicar o aumento da expressão de *E2F1* observado no tempo de 48 horas, uma vez que os tratamentos inibem a progressão do ciclo celular e a célula poderia estar iniciando a sinalização da apoptose.

Evidências recentes mostram que o locus genômico de *E2F1* encontra-se amplificado em vez de suprimido, em tumores malignos. E, em tumores que apresentam progressão letal, observa-se elevada expressão de *E2F1*. Estes mecanismos proporcionam uma explicação para a ocorrência de tumores malignos com altos níveis de expressão de *E2F1* na ausência de apoptose, o que diminuiria a eficácia da quimioterapia e/ou permitiria a evasão da célula tumoral à terapia.³³ Caso a indolin-3-ona não induza apoptose, apesar de pouco provável visto a diminuição da proliferação celular observada pelo nosso estudo, isto poderia ser uma resposta da célula para evadir ao tratamento aplicado e tentativa de sobrevivência.

Yu, Lane e Wadler (2002)³⁴ mostraram que indolinonas já em concentrações baixas (5 μ M) a partir de 24 horas de tratamento, têm a capacidade de inibir a expressão da proteína CCND1 além de prevenir a dissociação do complexo Rb/E2F1 em linhagens celulares de câncer colorretal (HT-29, RKO e SW480) mantendo assim, a progressão normal do ciclo celular.

O gene supressor tumoral *CDKN2A* não teve alterações significativas na sua expressão nos dois tempos de tratamento com indolin-3-ona.*CDKN2A* exerce sua atividade supressora tumoral por meio de suas proteínas p14 e p16, respectivamente, através da manutenção da integridade da proteína supressora tumoral p53 e da inibição na formação de complexos ciclinas/CDKs.³⁵ Sendo assim esse resultado se mostra interessante uma vez que o tratamento com indolin-3-ona não faz com que a célula perca esta via de atividade supressora tumoral.

O gene *TP53*, também supressor tumoral, teve sua expressão reprimida nas duas maiores condições de tratamento no tempo de 24 horas e somente no tratamento com 24 µg/mL no tratamento de 48 horas. A repressão na expressão de *TP53* está associada a mau prognóstico para o câncer, uma vez que este gene está relacionado com parada no ciclo celular, reparo de DNA, apoptose e senescência.³⁶

A apoptose é um processo de morte celular programada importante durante a diferenciação, crescimento e desenvolvimento de tecidos adultos saudáveis e patológicos. Pode ocorrer por meio de duas vias distintas, a via extrínseca e a via intrínseca ou mitocondrial.³⁷ Dentre os genes envolvidos neste processo que foram avaliados neste estudo, *BAX* e *BCL-XL* tiveram sua expressão aumentada significativamente na primeira condição de tratamento, e *BIRC5* e ainda *BCL-XL* tiveram sua expressão diminuída de maneira significativa na maior concentração de tratamento para o tratamento de 24 horas. No tratamento de 48 horas *BAX* e *BCL-XL* tiveram sua expressão modulada negativamente nas duas maiores concentrações de tratamento enquanto que *BIRC5* somente na concentração de 24 µg/mL.

A concentração de 24 µg/mL de indolin-3-onaparece favorecer o processo de apoptose na célula tumoral HepG2 no tempo de 24 horas de tratamento, visto que os genes anti-apoptóticos *BIRC5* e *BCL-XL* tiveram seus níveis de expressão reprimidos significativamente, e o gene pró-apoptótico *BAX* não teve seu nível de expressão significativamente alterado. Porém, no tempo de 48 horas de tratamento a expressão do gene *BAX*, assim como os outros, foi reprimida significativamente. Ainda não foi realizado um teste que avalie fenotipicamente o potencial apoptótico da indolin-3-ona, não permitindo que maiores conclusões sejam feitas sobre sua ação neste processo.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo apontam à capacidade deste novo derivado de indolinona de modular genes chaves envolvidos no processo de carcinogênese, justificando desta forma a continuidade de seu estudo e a sua indicação como uma nova molécula com potencial para a terapia do câncer.

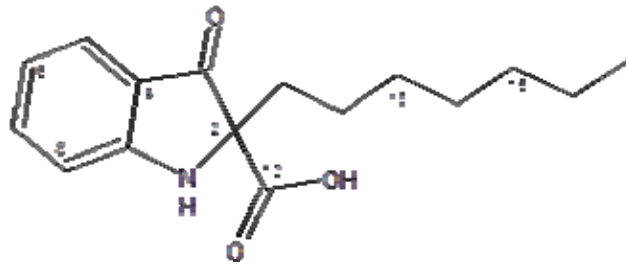
MATERIAIS E MÉTODOS

Compostos químicos

Indolin-3-ona

O composto foi isolado de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV e caracterizado como pertencente ao grupo das indolinonas pelo Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) da Universidade Estadual de Londrina. A indolin-3-ona purificada foi fornecida liofilizada e então diluída em metanol 10% para uso (figura 7).

Figura 7 – 2-carboxi-2-heptano-indolin-3-ona



Linhagem celular e condições de cultura

Para os experimentos realizados neste estudo foram utilizadas células de hepatocarcinoma humano, linhagem HepG2, que foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes do Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP, USP - Brasil).

As células HepG2 foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm², em 10 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – low glucose*) (Gibco – Life Technologies) suplementado com 15% de soro bovino fetal (Gibco – Life Technologies), 1% de solução antibiótico-antimicótico (Gibco – Life Technologies) e 2,37 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃ – Merck), sob condições de incubação de 37° C em atmosfera de 5% de CO₂.

Ensaio de hemólise

A atividade hemolítica da indolin-3-ona foi mensurada espectrofotometricamente pelo ensaio de liberação de hemoglobina, segundo protocolo descrito por Alves et al. (2012)³⁸ com modificações.

Foram utilizadas hemácias provenientes do sangue de um indivíduo saudável com tipagem sanguínea A⁺. Um volume de 600 µL das suspensões de hemácias a 4% em tampão fosfatosalino (PBS) foram expostas a nove concentrações de indolin-3-ona (2, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 40 e 48 µg/mL) durante um período de 24, 48, 72 e 96 horas a 37°C. Alíquotas de 100 µL da mesma suspensão foram retiradas a cada tempo de incubação, após 5 minutos de centrifugação a 1000 rpm. A quantidade de hemoglobina liberada foi mensurada espectrofotometricamente em 540 nm. Como controle negativo de hemólise as hemácias foram incubadas apenas com PBS e como controle de indução de danos à membrana a incubação foi realizada com 1% de Triton-X. Também foi realizado um grupo controle do solvente utilizado. Os resultados foram expressos como percentagem de hemólise pela fórmula $(\%) = (A_{\text{tratamento}} - A_{\text{CN}}) / (A_{\text{CP}} - A_{\text{CN}}) \times 100$. Este experimento foi realizado em triplicata técnica.

Ensaio do MTT

A avaliação da citotoxicidade celular pelo ensaio do MTT foi realizada como descrito por Mosmann (1983),³⁹ com modificações.

Foram semeadas 10⁴ células por poço em placas de cultura de 96 poços, com 200 µL de meio de cultura. Decorrido o tempo de estabilização de 24 horas a 37°C em 5% de CO₂, o meio de cultura foi substituído, após lavagem das células com PBS, pelos tratamentos com nove concentrações de indolin-3-ona (2 - 48 µg/mL) além de controle negativo com PBS e controle do solvente utilizado. As placas foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas a 37°C em 5% de CO₂. Foram realizadas oito réplicas técnicas de cada condição. Os tratamentos para os ensaios de MTT foram realizados tanto na presença (15%) quanto na ausência de soro bovino fetal.

Decorrido os períodos de tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 4 horas após adição de 100 µL da solução de MTT a 0,5

mg/mL (Amresco). Para solubilização dos cristais de formazan foram utilizados 200 μ L de DMSO. A mensuração da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (BioTek) a 570 nm. O percentual de viabilidade celular foi calculado de acordo com a fórmula (%) = $(A_{\text{tratamento}}/A_{\text{CN}}) \times 100$. Os valores do controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular para normalização dos dados obtidos.

Ensaio de exclusão pelo Azul de Tripán

Neste ensaio as células viáveis não permitem a entrada do corante Azul de Tripán, e as células com danos na membrana e/ou inviáveis apresentavam coloração azulada devido à internalização deste corante. As células HepG2 foram tratadas com as concentrações de 8, 16 e 24 μ g/mL de indol-3-pirrolizidina, por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após o desprendimento das células, uma alíquota de 10 μ L da suspensão celular foi misturada a 10 μ L de solução de Azul de Tripán (Acrós Organics) 0,04%. Um total de 200 células de cada tratamento foi contado com o auxílio de Câmara de Neubauer. O percentual de células viáveis foi calculado seguindo a equação (%) = $\text{total de células viáveis contadas} \times 100 / 200$.

Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativa em tempo real

Após estabilização de 6×10^4 células da linhagem HepG2, cultivadas em placa de 24 poços com 1 mL de meio de cultura DMEM por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi substituído pelos seguintes tratamentos: 3 concentrações de indol-3-pirrolizidina (8, 16 e 24 μ g/mL) e um controle negativo (meio de cultura com PBS). O experimento foi realizado nos tempos de 24 e 48 horas.

A extração do RNA total foi realizada com o reagente TRIzol® (Ambion – Life Technologies) segundo as especificações do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA foram determinadas por espectrofotometria (Biophotometer – Eppendorf), levando em consideração para validação amostral a razão de absorbância 260nm/280nm entre 1,7 e 2,0. A integridade do RNA foi mensurada por eletroforese em gel de agarose denaturante segundo Aranda et al.

(2012).⁴⁰ As amostras de RNA foram tratadas com DNase Amplification Grade (Invitrogen – Life Technologies) segundo recomendações do fabricante.

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg do RNA total extraído para o tratamento de 24 horas, e 300 ng/mL para o tratamento de 48 horas. O volume final da reação foi de 20 µL, composto por 10% de tampão de enzima (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl – Invitrogen – Life Technologies), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen – Life Technologies), 0,5 mM de dNTPs (Invitrogen – Life Technologies), 80 pmol de Oligo dT¹²⁻¹⁸ (Invitrogen – Life Technologies), 100 pmol de Random Primers (Invitrogen – Life Technologies), 10 unidades da enzima SuperScript III (Invitrogen – Life Technologies) e 2 unidades da enzima RNase Out (Invitrogen – Life Technologies). Inicialmente, uma mistura constituída apenas por RNA, Oligo dT¹²⁻¹⁸, Random Primers e dNTPs foi submetida a uma pré-incubação de 10 minutos a 65° C em termociclador Veriti (Applied Biosystems), seguido de choque térmico a -20° C. Uma segunda mistura contendo os demais constituintes foi preparada e adicionada a mistura inicial, totalizando 20 µL. Em sequência, a mistura final obtida foi submetida ao seguinte programa de reação em termociclador Veriti: 2 minutos a 25° C, 45 minutos a 50° C e 15 minutos a 70° C.

Para minimizar variações de desempenho da transcriptase reversa e a possibilidade do efeito Monte Carlo, três reações distintas de síntese de cDNA foram realizadas para cada experimento, cujos produtos foram incorporados para obtenção de uma única mistura referente a cada amostra em sua respectiva condição de cultivo. Os cDNAs sintetizados também foram quantificados e verificados quanto sua qualidade por espectrofotometria, e a concentração final ajustada para 50 ng/µL.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados empregando o programa *Gene Runner* versão 3.05,⁴¹ exceto para o gene *CDK4*, obtido do banco de dados GETPrime (<http://updepla1srv1.epfl.ch/getprime/>).⁴² As sequências dos genes alvo *MET*, *c-MYC*, *CDKN2A*, *CCND1*, *CCNA2*, *E2F1*, *BIRC5*, *BAX*, *BCL-XL*, *TP53* e dos genes de referência *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1*) foram obtidas a partir de regiões específicas descritas e depositadas no *National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), considerando todas as variantes transcricionais também descritas para cada gene. O programa *BioEdit Alignment Editor* versão 7.09⁴³ foi utilizado para o alinhamento das variantes

transcricionais de cada gene para determinação de regiões conservadas para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores. A especificidade de cada oligonucleotídeo foi avaliada com o auxílio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Os dados referentes à expressão gênica foram obtidos pelo emprego da técnica de PCR em tempo real, com a utilização do sistema *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad). Para tal, foi utilizado o kit *SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad), seguindo recomendações do fabricante, para um volume final de 10 µL, utilizando 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 250 ng de cDNA molde.

A mistura de reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 95° C por 5 minutos; 40 repetições de ciclos de 15 segundos a 95° C (desnaturação), 15 segundos a 60° C (anelamento) e 30 segundos a 72° C (extensão). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra assegurando que apenas o produto de interesse fosse amplificado em cada reação, por meio da curva de fusão (*melting curve*), variando-se a temperatura de 50°C a 98°C em 0,5°C/2 segundos. Os dados foram analisados pelo *CFX Manager™ software* (Bio-Rad). A eficiência de cada par de oligonucleotídeos foi determinada pelo *LinReg PCR software*.⁴⁴

Para determinação da expressão relativa dos genes de interesse nas diferentes condições avaliadas foi utilizado o programa *REST – versão 2009 (Relative expression software tool)* (QIAGEN), desenvolvido por Pfafflet al.,(2002)⁴⁵ baseado em seu próprio modelo matemático de quantificação relativa de dados obtidos por PCR em tempo real, com correção de eficiência⁴⁶. Os valores obtidos na situação controle (ausência de tratamento) foram utilizados como referência para comparação, e os cálculos foram normalizados a partir dos genes de referência *GAPDH* e *HPRT1*. Foram considerados apenas valores de *Cq* (*quantification cycle*) com uma variação de $\pm 0,5$ entre as triplicatas de reação.

Análises estatísticas

Os dados obtidos nos ensaios de hemólise, MTT, Azul de Tripán e cometa, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Todos os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico *GraphPad InStat* versão 3.05. O programa estatístico R versão 2.15.1, foi utilizado para realizar a análise de regressão dos dados obtidos no ensaio de MTT com soro bovino fetal.

O programa REST que utiliza o modelo estatístico denominado *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*, foi utilizado para avaliar os dados obtidos na qPCR, determinando quais genes alvo apresentaram expressão diferencial. Foram considerados diferencialmente expressos quando comparados à situação controle os genes cuja alteração foi significativamente diferente considerando o valor de $p \leq 0,01$ ou alterações maiores que duas vezes considerando valor de $p < 0,05$.

INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR

Informações sobre sequência dos oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos amplificados e suas eficiências de reações para os tempos de 24 e 48 horas estão expostas na tabela 1 no material suplementar. As análises de regressão e respectivas equações dos ensaios do MTT com sorobovino fetal também estão disponíveis no material suplementar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- (1) MILES LAB. John William Van Dyke Jr. **1-substituted derivatives of 2-indolinone**. US 3573310 A, set. 1967, mar. 1971.
- (2) TERZIOGLU, N.; KARAH, N.; GÜRSOY, A.; PANNECOUQUE, C.; LEYSEN B, P.; PAESHUYSE, J.; NEYTS, J.; CLERCQ, E. Synthesis and primary antiviral activity evaluation of 3-hydrazono-5-nitro-2-indolinone derivatives. *ARKIVOC*. **2005**, 2006, 109-118.
- (3) CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L.; OLIVEIRA, E. V.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; PECCININI, R. G. Synthesis, ex vivo and in vitro hydrolysis study of an indoline derivative designed as an anti-inflammatory with reduced gastric ulceration properties. *Molecules*. **2009**, 14,3187-3197.
- (4) SEARLE & CO. William E. Coyne; John W. Cusic. **Dialkylaminoalkyl-indolines**. US 3558653 A, 26 jan. 1971, 20 maio 1968.
- (5) SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quím. Nova*. **2009**, 32,453-462.
- (6) DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY. Jiann-Jyh Huang; Chao-Cheng Chiang; Chiawei Liu; Chun-Liang Lai; Shu Fu Lin; Yu-Hsiang Lin; Ru-Wen Wang; Sheng-Chuan Yang; Jia-Ming Chang; Shih-Hsien Chuang; Paonien Chen. **Indolinone compounds as kinase inhibitors**. US 7897602 B2, 26 jun. 2009, 1 mar. 2011.
- (7) ZOU, H.; ZHANG, L.; OUYANG, J.; GIULIANOTTI, M. A.; YU, Y. Synthesis and biological evaluation of 2-indolinone derivatives as potential antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5970-5977.
- (8) SUGEN, INC. Gerald McMahon; Li Sun; Peng Cho Tang. **3-(4'-dimethylaminobenzylidényl)-2-indolinone and analogues thereof for the treatment of disease**. US 5886020 A, 5 jun. 1996, 23 mar. 1999.
- (9) SHENZHEN CHIPSCREEN BIOSCIENCES LTD. Xiang-Ping Lu; Zhi-Bin Li; Zhi-Qiang Ning. **2-indolinone derivatives as multi-target protein kinase inhibitors and histone deacetylase inhibitors**. US8158656 B2, 8 maio 2009, 17 abr. 2012.
- (10) SHAWVER, L. K.; SLAMON, D.; ULLRICH, A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell*. **2002**, 1,117-123.
- (11) KIRKIN, V.; THIELE, W.; BAUMANN, P.; MAZITSCHKE, R.; ROHDE, K.; FELLBRICH, G.; WEICH, H.; WALTENBERGER, J.; GIANNIS, A.; SLEEMAN, J. P. MAZ51, an indolinone that inhibits endothelial cell and tumor cell growth in vitro, suppresses tumor growth in vivo. *Int. J. Cancer*. **2004**, 112, 986-993.
- (12) ROTH, G. J.; HECKEL, A.; COLBATZKY, F.; HANDSCHUH, S.; KLEY, J.; LEHMANN-LINTZ, T.; LOTZ, R.; TONTSCH-GRUNT, U.; WALTER, R.;

- HILBERG, F. Design, synthesis, and evaluation of indolinones as triple angiokinase inhibitors and the discovery of a highly specific 6-methoxycarbonyl-substituted indolinone (BIBF 1120). *J. Med. Chem.***2009**,52,4466-4480.
- (13) WALSANGIKAR, S. D.; KULKARNI, A. S. Angiogenesis inhibitors targets for cancer treatment. *Int. J. A. PS. BMS.* **2013**, 2, 52-60.
- (14) KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.***2002**, 23, 417-425.
- (15) AGOURON PHARMACEUTICALS, INC. Peng Cho Tang; Todd A. Miller; Xiaoyuan Li; Li Sun; Chung Chen Wei; Shahrzad Shirazian; Congxin Liang; Tomas Vojtkovsky; Assad S. Nematalla; Michael Hawley. **Pyrrrole substituted 2-indolinone protein kinase inhibitors**. US7125905 B2, 4 jan. 2005, 24 out. 2006.
- (16) CASSINELLI, G.; LANZI, C.; PETRANGOLINI, G.; TORTORETO, M.; PRATESI, G.; CUCCURU, G.; LACCABUE, D.; SUPINO, R.; BELLUCO, S.; FAVINI, E.; POLETTI, A.; ZUNINO, F. Inhibition of c-Met and prevention of spontaneous metastatic spreading by the 2-indolinone RPI-1. *Mol. Cancer Ther.***2006**, 5,2388-2397.
- (17) KRYSTAL, G. W.; HONSAWEK, S.; KIEWLICH, D.; LIANG, C.; VASILE, S.; SUN, L.; MCMAHON, G.; LIPSON, K. E. Indolinone tyrosine kinase inhibitors block Kit activation and growth of small cell lung cancer cells. *Cancer Res.***2001**, 61,3660-3668.
- (18) LATHAM, A. M.; BRUNS, A. F.; KAMKANALA, J.; JOHNSON, A. P.; FISHWICK, C. W. G.; HOMER-VANNIASINKAM, S.; PONNAMBALAM, S. Indolinones and anilinophthalazines differentially target VEGF-A- and basic fibroblast growth factor-mediated responses in primary human endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.***2012**, 165,245-259.
- (19) LIAO, A. T.; CHIEN, M. B.; SHENOY, N.; MENDEL, D. B.; MCMAHON, G.; CHERRINGTON, J. M.; LONDON, C. A. Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood.***2002**, 100, 585-593.
- (20) STANGANELLI, M. M. *Isolamento e identificação de derivado de indolin-3-ona produzido por cepa selvagem de Pseudomonas aeruginosa.***2013**.45 Pg. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- (21) FISCHER, D.; LI, Y.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; KISSEL, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials.***2003**, 24, 1121-1131.
- (22) SCHERLIESS, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *Int. J. Pharm.***2011**, 411, p. 98-105.

- (23) BERNHARD, D.; SCHWAIGER, W.; CRAZZOLARA, R.; TINHOFER, I.; KOFLEER, R.; CSORDAS, A. Enhanced MTT - reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett.***2003**,195,193-199.
- (24) PELLEGRINO, S.; RUSCICA, M.; MAGNI, P.; VISTOLI, G.; GELMI, M. L. Antiproliferative activity on human prostate carcinoma cell lines of newpeptidomimetics containing the spiroazepinoindolinone scaffold. *Bioorg. Med. Chem.***2013**, 21, 5470-5479.
- (25) COMOGLIO, P. M. Pathway specificity for Met signalling. *Nat. Cell Biol.***2001**, 3, E161–E162.
- (26) CHRISTENSEN, J. G.; BURROWS, J.; SALGIA, R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.***2005**, 225,1-26.
- (27) STELLRECHT, C. M.; GANDHI, V. MET receptor tyrosine kinase as a therapeutic anticancer target. *Cancer Lett.***2009**, 280, 1-14.
- (28) OBAYA, A. J.; KOTENKO, I.; COLE, M. D.; SEDIVY, J. M. The proto-oncogene *c-myc* acts through the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27^{Kip1} to facilitate the activation of Cdk4/6 and early G1 phase progression. *J. Biol. Chem.***2002**,277,31263-31269.
- (29) WANG, C.; LISANTI, M. P.; LIAO, D. J. Reviewing once more the c-myc and Ras collaboration converging at the cyclin D1-CDK4 complex and challenging basic concepts of cancer biology. *Cell Cycle.***2011**, 10, 57-67.
- (30) NEVINS, J. R. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum. Mol. Genet.***2001**, 10, 699-703.
- (31) ROGOFF, H. A.; KOWALIK, T. F. Life, death and E2F: linking proliferation control and DNA damage signaling via E2F1. *Cell Cycle.***2004**, 3, 845-846.
- (32) STANELLE, J.; PÜTZER, B. M. E2f-1 induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol. Med.***2006**, 12, 177-185.
- (33) PÜTZER, B. M.; ENGELMANN, D. E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back. *Trends Mol. Med.***2006**, 19, 89-98.
- (34) YU, B.; LANE, M. E.; WADLER, S. SU9516, a cyclin-dependent kinase 2 inhibitor, promotes accumulation of high molecular weight E2f complexes in human colon carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.***2002**,64,1091-1100.
- (35) RUAS, M.; PETERS, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, 1378, 155-177.
- (36) CARVAJAL, L. A.; MANFREDI, J. J. Another fork in the road--life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep.***2013**, 14, 414-421.

- (37) MOHAMMED, K. A.; WANG, X.; GOLDBERG, E. P.; ANTONY, V. B.; NASREEN, N. Silencing receptor EphA2 induces apoptosis and attenuates tumor growth in malignant mesothelioma. *Am. J. Cancer Res.***2011**, 1, 419-431.
- (38) ALVES, M. G. C. F.; DORE, C. M. P. G.; CASTRO, A. J. G.; NASCIMENTO, M. S.; CRUZ, A. K. M.; SORIANO, E. M.; BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, E. L. Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. *J. Appl. Physiol.***2012**, 24, 1217-1227.
- (39) MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.***1983**, 65,55-63.
- (40) ARANDA, P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis.***2012**,33,366-369.
- (41) SPRUYT, M.; BUQUICCHIO, F. Gene Runner Version 3.01. *Hastings Software, Inc., 1994*. Disponível em <http://www.generunner.net/>.
- (42) GUBELMANN, C.; GATTIKER, A.; MASSOURAS, A.; HENS, K.; DAVID, F.; DECOUTTERE, F.; ROUGEMONT, J.; DEPLANCKE, B. GETPrime: a gene- or transcript-specific primer database for quantitative real-time PCR. *Database (Oxford).***2011**, 2011.
- (43) HALL, T. BioEdit Alignment Editor Version 7.09. *Ibis Biosciences, 1997*. Disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
- (44) RUIJTER, J. M.; RAMARKEERS, C.; HOOGARS, W. M.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J.; MOORMAN, A. F. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.***2009**, 37, e45.
- (45) PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, e36.
- (46) PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.***2001**, 29, e45.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1 – Relação e especificações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e suas eficiências de reação na qPCR.

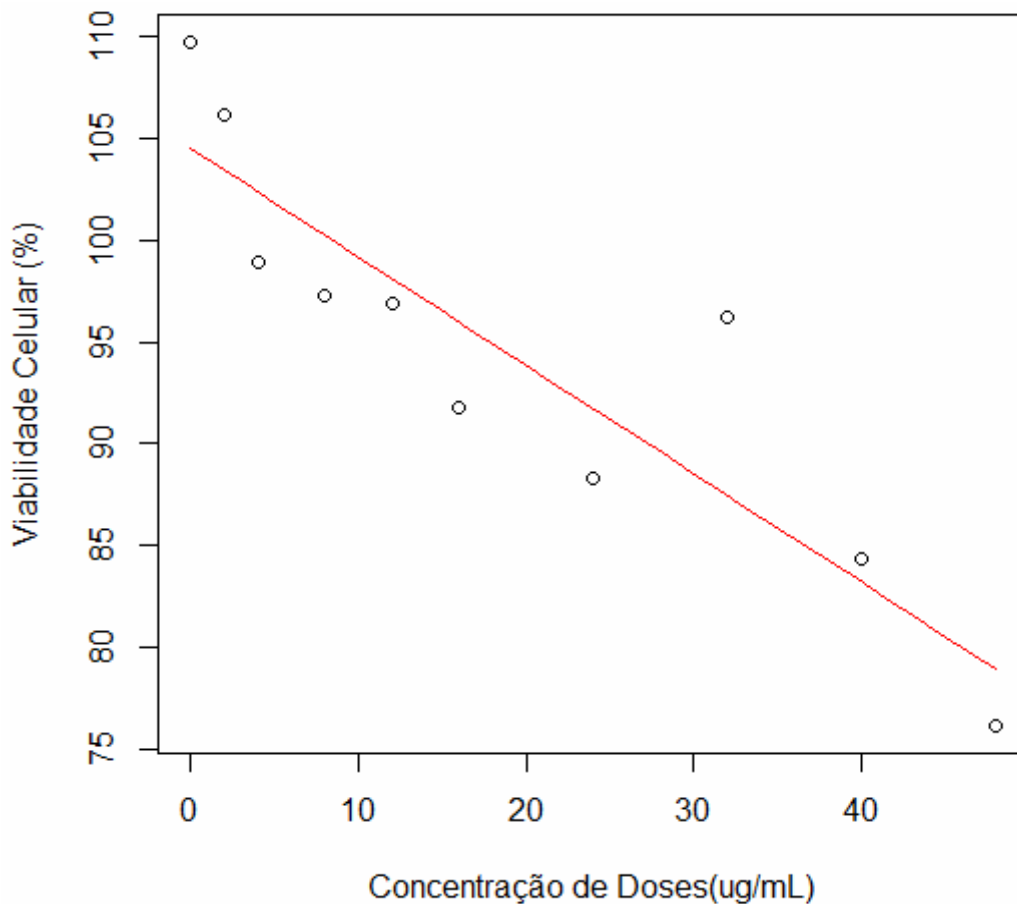
Gene	Sequência 5' - 3'	Tamanho dos produtos de amplificação (pares de base)	Eficiência de reação	
			24 horas	48 horas
<i>MET</i>	F: TACGGTCCTATGGCTGGT R: CTCTCGGTTGGCTAAGTC	201	2,080	1,958
<i>c-MYC</i>	F: GGACTGTATGTGGAGCG R: TCGTTGAGAGGGTAGGG	211	1,997	1,954
<i>CDK4</i>	F: TTTGAGCATCCCAATGTTGTC R: GACGAAACATCTCTTGATCTCC	80	2,015	1,951
<i>CDKN2A</i>	F: CTGCCCGTGGACCTG R: ATGGTTACTGCCTCTGG	89	2,124	1,993
<i>CCND1</i>	F: CATTGAACACTTCCTCTCCA R: AACTTCACATCTGTGGCAC	140	2,046	2,006
<i>CCNA2</i>	F: GACCCTGCATTTGGCTGTG R: ACAAACTCTGCTACTTCTGG	146	1,987	1,926
<i>E2F1</i>	F: GCCAAGAAGTCCAAGAACC R: GTCAACCCCTCAAGCCGTC	79	1,959	1,953
<i>BIRC5</i>	F: GACTTGTGTGTGATGAGAG R: TAGAATGGCTTTGTGCTTAG	138	2,073	1,953
<i>BAX</i>	F: TTTCTGACGGCAACTTCAACTGGG R: TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT	121	2,052	1,951
<i>BCL-XL</i>	F: CAGCCGAGAGCCGAAAGG R: GAGGGTAGAGTGGATGGTC	132	2,014	2,006
<i>TP53</i>	F: CCATCCACTACAACACTACAT R: GCACAAACACGCACCTC	136	1,988	1,993
<i>HPRT1</i>	F: TCCTCTGCTCCGCCACCG R: TCATCACTAATCACGACGCC	101	1,961	1,989
<i>GAPDH</i>	F: GGGCATCCTGGGCTACACT R: GGTCCAGGGGTCTTACTC	208	2,073	2,069

Análise de regressão

Ensaio do MTT com soro bovino fetal

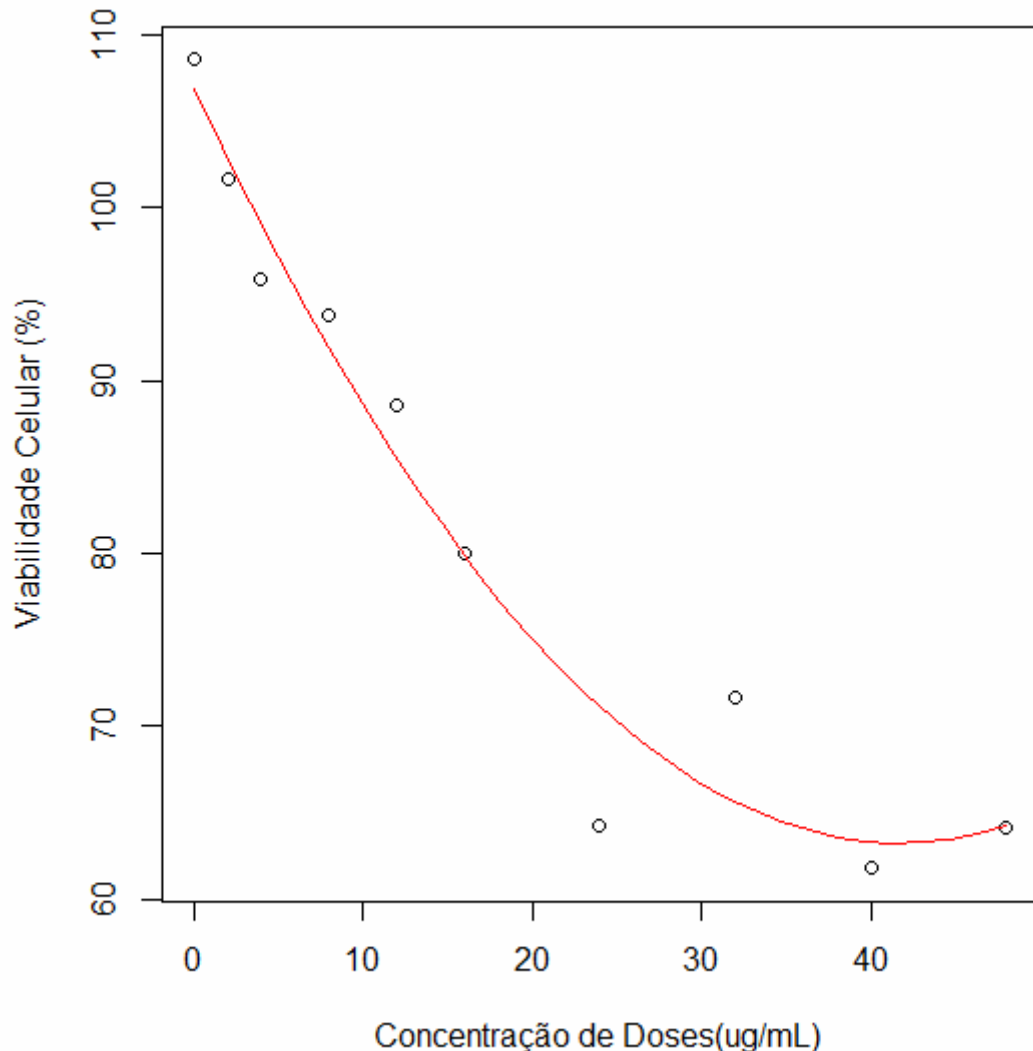
Para o tempo 24 horas de ensaio observou-se alta precisão do experimento, considerando que o coeficiente de variação foi de 4,77%. Após análises, o melhor modelo de regressão ajustado aos dados foi o modelo de regressão linear, obtendo a função $y = 104,50 - 0,53x$. Ademais, esse modelo explica, aproximadamente, 80,78% da viabilidade celular (Figura 8). Em linhas gerais, que o valor basal de viabilidade celular, neste ensaio, foi de 104,50% e que para cada unidade aumentada na concentração de indolin-3-ona diminuirá 0,53% da porcentagem de viabilidade celular.

Figura 8 – Regressão linear para o ensaio do MTT (com soro bovino fetal) no tempo de 24 horas de tratamento.



O tempo de 72 horas também obteve uma alta precisão do experimento, já que o coeficiente de variação foi de 4,12%. Após análises, o melhor modelo de regressão ajustado aos dados foi o modelo de regressão quadrático, obtendo a função $y = 106,95 - 2,09x + 0,03x^2$. Ademais, esse modelo explica, aproximadamente, 95,59% da viabilidade celular (Figura 9). Em linhas gerais, a concentração de indolin-3-ona para atingir a mínima viabilidade celular, neste caso de 63,24%, é de 41,79 $\mu\text{g/mL}$.

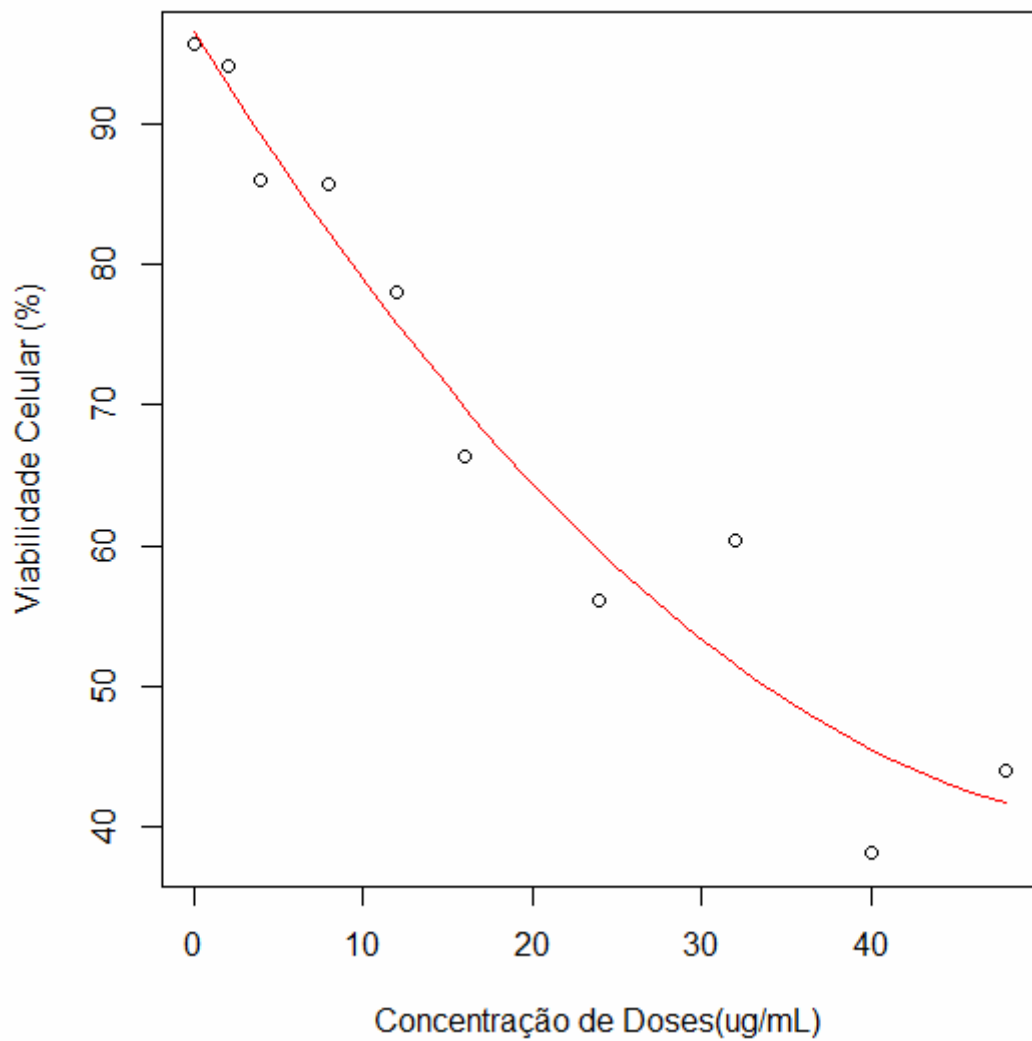
Figura 9 – Regressão linear para o ensaio do MTT (com soro bovino fetal) no tempo de 72 horas de tratamento.



Por fim, o tempo de 96 horas de ensaio também possui alta precisão do experimento, já que o coeficiente de variação foi de 5,59%. Após análises, o melhor modelo de regressão ajustado aos dados foi o modelo de regressão

quadrático, obtendo a função $y = 96,53 - 1,93x + 0,02x^2$. Ademais, esse modelo explica, aproximadamente, 94,95% da viabilidade celular (Figura 10). Em conclusão, a concentração de indolin-3-ona para atingir a mínima viabilidade celular, neste caso de 39,74%, é de 58,87 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 10 – Regressão linear para o ensaio do MTT (com soro bovino fetal) no tempo de 96 horas de tratamento.



5 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

A indolin-3-ona apresenta efeitos citotóxicos e antiproliferativo sobre eritrócitos humanos e células de hepatocarcinoma humano, linhagem HepG2, mensurados pelos ensaios de hemólise e do MTT, respectivamente. Os resultados observados foram dose-tempo-dependentes, se intensificando de acordo com a variável em questão.

A indolin-3-ona apresenta atividade genotóxica para as células HepG2 nas concentrações de 16 e 24 µg/mL em 24 horas de tratamento, observada no ensaio do cometa.

De uma forma geral todos os genes estudados (*MET*, *c-MYC*, *CDKN2A*, *CDK4*, *CCND1*, *CCNA2*, *E2F1*, *BIRC5*, *BAX*, *BCL-XL* e *TP53*) tiveram sua expressão reprimida, com maior intensidade observada para os proto-oncogenes. Esta repressão na expressão aumentou em função da concentração da indolin-3-ona utilizada e em função do tempo de exposição a este composto.

A indolin-3-ona apresentou a capacidade de modular genes chaves envolvidos no processo de carcinogênese, e assim, os dados obtidos justificam a continuidade de estudos com este composto e apontam para sua indicação como uma nova molécula com potencial utilização para a terapia do câncer.

REFERÊNCIAS

- AI-KHAMI, A. A.; MEHROTRA, S.; NISHIMURA, M. I. Adoptive immunotherapy of cancer. **Self/Nonself**, v. 2, n. 2, p. 80-84, 2011.
- ALONSO-CASTRO, A. J.; VILLARREAL, M. L.; SALAZAR-OLIVO, L. A.; GOMEZ-SANCHEZ, M.; DOMINGUEZ, F.; GARCIA-CARRANCA, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 945-972, 2011.
- ATKINS, M.; JONES, C. A.; KIRKPATRICK, P. Sunitinib maleate. **Nature Reviews, Drug Discovery**, v. 5, n. 4, p. 279-280, 2006.
- BABAN, C. K.; CRONIN, M.; O'HANLON, D.; O'SULLIVAN, G. C.; TANGNEY, M. Bacterial as vectors for gene therapy of cancer. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 6, p.385-394, 2010.
- BACHMANN, I. M.; STRAUME, O.; AKSLEN, L. A. Altered expression of cell cycle regulators cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. **International Journal of Oncology**, v. 25, n. 6, p. 1559-1565, 2004.
- BENZENO, S.; LU, F.; GUO, M.; BARBASH, O.; ZHANG, F.; HERMAN, J. G.; KLEIN, O. S.; RUTGI, A.; DIEHL, J. A. Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. **Oncogene**, v. 25, n. 47, p. 6291-6303, 2006.
- BERNHARD, D.; SCHWAIGER, W.; CRAZZOLARA, R.; TINHOFER, I.; KOFLER, R.; CSORDAS, A. Enhanced MTT - reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 195, n. 2, p.193-199, 2003.
- BEROUKHIM, R.; MERMEL, C. H.; PORTER, D.; WEI, G.; RAYCHAUDHURI, S.; DONOVAN, J.; BARRETINA, J.; BOEHM, J. S.; DOBSON, J.; URASHIMA, M.; MCHENRY, K. T.; PINCHBACK, R. M.; LIGON, A. H.; CHO, Y. J.; HAERY, L.; GREULICH, H.; REICH, M.; WINCKLER, W.; LAWRENCE, M. S.; WEIR, B. A.; TANAKA, K. E.; CHIANG, D. Y.; BASS, A. J.; LOO, A.; HOFFMAN, C.; PRENSNER, J.; LIEFELD, T.; GAO, Q.; YECIES, D.; SIGNORETTI, S.; MAHER, E.; KAYE, F. J.; SASAKI, H.; TEPPER, J. E.; FLETCHER, J. A.; TABERNERO, J.; BASELGA, J.; TSAO, M. S.; DEMICHELIS, F.; RUBIN, M. A.; JANNE, P. A.; DALY, M. J.; NUCERA, C.; LEVINE, R. L.; EBERT, B. L.; GABRIEL, S.; RUSTGI, A. K.; ANTONESCU, C. R.; LADANYI, M.; LETAI, A.; GARRAWAY, L. A.; LODA, M.; BEER, D. G.; TRUE, L. D.; OKAMOTO, A.; POMEROY, S. L.; SINGER, S.; GOLUB, T. R.; LANDER, E. S.; GETZ, G.; SELLERS, W. R.; MEYERSON, M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature**, v. 463, n. 7283, p. 899-905, 2010.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT

reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.

BIRCHMEIER, C.; BIRCHMEIER, W.; GHERARDI, E.; VANDE WOUDE, G. F. Met, metastasis, motility and more. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 12, p. 915-925, 2003.

BOECHAT, N.; KOVER, W. B.; BONGERTZ, V.; BASTOS, M. M.; ROMEIRO, N. C.; AZEVEDO, M. L.; WOLLINGER, W. Design, synthesis and pharmacological evaluation of HIV-1 reverse transcriptase inhibition of new indolin-2-ones. **Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 533-542, 2007.

BOUCHIKHI, F.; ROSSIGNOL, E.; SANCELME, M.; ABOAB, B.; ANIZON, F.; FABBRO, D.; PRUDHOMME, M.; MOREAU, P. Synthesis and biological evaluation of diversely substituted indolin-2-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2316-2322, 2008.

BOUERAT, L.; FENSHOLDT, J.; LIANG, X.; HAVEZ, S.; NIELSEN, S. F.; HANSEN, J. R.; BOLVIG, S.; ANDERSSON, C. Indolin-2-ones with high in vivo efficacy in a model for multiple sclerosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 17, p. 5412-5414, 2005.

BUI, K. C.; WU, F.; BUCKLEY, S.; WU, L.; WILLIAMS, R.; CARBONARO-HALL, D.; HALL, F. L.; WARBURTON, D. Cyclin A expression in normal and transformed alveolar epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology**, v. 9, n. 2, p.115-125, 1993.

CAO, S.; CRIPPS, A.; WEI, M. Q. New strategies for cancer gene therapy: progress and opportunities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 1, p. 108-114, 2010.

CHAN, S.; YU, V. C. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, n. 3, p. 119-128, 2004.

CHEN, H. Z.; TSAI, S. Y.; LEONE, G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 11, p. 785-797, 2009.

CHEN, Y. B.; AON, M. A.; HSU, Y. T.; SOANE, L.; TENG, X.; MCCAFFERY, J. M.; CHENG, W. C.; QI, B.; LI, H.; ALAVIAN, K. N.; DAYHOFF-BRANNIGAN, M.; ZOU, S.; PINEDA, F. J.; O'ROURKE, B.; KO, Y. H.; PEDERSEN, P. L.; KACZMAREK, L. K.; JONAS, E. A.; HARDWICK, J. M. Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 2, p.263-276, 2011.

COMOGLIO, P. M.; BOCCACCIO, C. Scatter factors and invasive growth. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11, n. 2, p. 153-165, 2001.

DEEPAK, S. A.; KOTTAPALLI, K. R.; RAKWAL, R.; OROS, G.; RANGAPPA, K. S.; IWAHASHI, H.; MASUO, Y.; AGRAWAL, G. K. Real-Time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. **Current Genomics**, v. 8, n. 4, p. 234-251, 2007.

DOHI, T.; OKADA, K.; XIA, F.; WILFORD, C. E.; SAMUEL, T.; WELSH, K.; MARUSAWA, H.; ZOU, H.; ARMSTRONG, R.; MATSUZAWA, S.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C.; ALTIERI, D. C. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34087-34090, 2004.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes & Development**, v. 12, n. 15, p. 2245-2262, 1998.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 23-47.

FACCHINI, L. M.; PENN, L. Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 9, p. 633-651, 1998.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogenec-*MYC* no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 165-171, 2006.

FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, n. 1-2, p. 8-15, 2005.

FORNELLI, F.; MINERVINI, F.; LOGRIECO, A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 2, p. 74-79, 2004.

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, 2006.

FURGE, K. A.; ZHANG, Y. W.; VANDE WOUDE, G. F. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. **Oncogene**, v. 19, n. 49, p. 5582-5589, 2000.

GRÜNWARD, V.; KALANOVIC, D.; MERSEBURGER, A. Management of sunitinib-related adverse events: an evidence- and expert-based consensus approach. **World Journal of Urology**, v. 28, n. 3, p. 343-351, 2010.

HALABAN, R. Rb/E2F: a two-edged sword in the melanocytic system. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 24, n. 2, p. 339-356, 2005.

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

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266, n. 5192, p. 1821-1828, 1994.

HENG, D. Y. C.; KOLLMANNBERGER, C. Sunitinib. **Recent Results in Cancer Research**, v. 184, p. 71-82, 2010.

HICKMAN, J. A. Apoptosis and tumorigenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, n. 1, p. 67-72, 2002.

HOLCIK, M. The IAP proteins. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 10, p. 537-538, 2002.

HORN, H. F.; VOUSDEN, K. H. Coping with stress: multiple ways to activate p53. **Oncogene**, v.26, n. 9, p.1306-1316, 2007.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2011.

JIRAWATNOTAI, S.; HU, Y.; LIVINGSTON, D. M.; SICINSK, P. Proteomic identification of a direct role for cyclin D1 in DNA damage repair. **Cancer Research**, v. 72, n.17, p. 4289-4293, 2012.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683-692, 2007.

KARBOWSKI, M.; LEE, Y. J.; GAUME, B.; JEONG, S. Y.; FRANK, S.; NECHUSHTAN, A.; SANTEL, A.; FULLER, M.; SMITH, C. L.; YOULE, R. J. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 159, n. 6, p. 931-938, 2002.

KIM, W. Y.; SHARPLESS, N. E. The regulation of *INK4/ARF* in cancer and aging. **Cell**, v.127, n. 2, p. 265-275, 2006.

KIRKIN, V.; THIELE, W.; BAUMANN, P.; MAZITSCHKEK, R.; ROHDE, K.; FELLBRICH, G.; WEICH, H.; WALTENBERGER, J.; GIANNIS, A.; SLEEMAN, J. P. MAZ51, an indolinone that inhibits endothelial cell and tumor cell growth in vitro, suppresses tumor growth in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 112, n. 6, p. 986-993, 2004.

KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 9, p.417-425, 2002.

KNUDSON, A. G. Two genetics hits (more or less) to cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v.1, n. 2, p. 157-162, 2001.

KOHNO, T.; YOKOTA, J. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivation of the p16 tumor suppressor gene in human cancer: deduction from structural analysis of breakpoints for deletions. **DNA Repair**, v. 5, n. 9-10, p. 1273-1281, 2006.

KONG, L. J.; CHANG, J. T.; BILD, A. H.; NEVINS, J. R. Compensation and specificity of function within the E2F family. **Oncogene**, v. 26, n. 3, p. 321-327. 2007.

KRIEG, A.; WERNER, T. A.; VERDE, P. E.; STOECKLEIN, N. H.; KNOEFEL, W. T. Prognostic and clinicopathological significance of survivin in colorectal cancer: a meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, e65338, 2013.

KUMAR, S. P.; GUT, J.; GUEDES, R. C.; ROSENTHAL, P. J.; SANTOS, M. M.; MOREIRA, R. Design, synthesis and evaluation of 3-methylene-substituted indolinones as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 927-933, 2011.

LI, T.; KON, N.; JIANG, L.; TAN, M.; LUDWIG, T.; ZHAO, Y.; BAER, R.; GU, W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. **Cell**, v. 149, n. 6, p.1269-1283, 2012.

LOURO, I. D. Proto-oncogenes e genes supressores de tumor. In LOURO, I. D.; LLERENA JR., J. C.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FRÓES, N. (Org.). **Genética Molecular do Câncer**. São Paulo: MSG ProduçãoEditorial, 2002, p. 63-79.

LOVE, S.A.; MAURER-JONES, M. A.; THOMPSON, J. W.; LIN, Y. S.; HAYNES, C. L. Assessing nanoparticle toxicity. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 5, p. 181-205, 2012.

MCCONKEY, D. J.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: molecular mechanisms and biomedical implications. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-110, 1996.

MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 36, n. 8, p. 639-543, 2000.

MIGLIORE, C.; GIORDANO, S. Molecular cancer therapy: Can our expectation be MET? **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 5, p. 641-651, 2008.

MINATO, Y. Involvement of E2F in cellular proliferation by regulating growth factor receptor expression. In: YOSHIDA, K. (Ed.). **Control of cellular physiology by E2F transcription factors**. Kerala: Research Signpost, 2008. p. 153-165.

MITA, A. C.; MITA, M. M.; NAWROCKI, S. T.; GILES, F. J. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 16, p. 5000-5005, 2008.

MOHAMMADI, M.; MCMAHON, G.; SUN, L.; TANG, C.; HIRTH, P.; YEH, B. K.; HUBBARD, S. R.; SCHLESSINGER, J. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. **Science**, v. 276, n. 5314, p. 955-960, 1997.

MONTENEGRO, M. F.; SÁNCHEZ-DEL-CAMPO, L.; FERNÁNDEZ-PÉRES, M. P.; SÁEZ-AYALA, M.; CABEZAS-HERRERA, J.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Targeting the epigenetic machinery of cancer cells. **Oncogene**, 2014.

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, 1983.

MOTZER, R. J.; HUDES, G. R.; GINSBERG, M. S.; BAUM, M. S.; HARMON, C. S.; KIM, S. T.; CHEN, I.; REDMAN, B. G. Phase I/II trial of sunitinib plus gefitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 33, p. 614-618, 2010.

MUND, C.; LYKO, F. Epigenetic cancer therapy: proof of concept and remaining challenges. **Bioessays**, v. 32, n. 11, p. 949-957, 2010.

OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 609-619, 1993.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 4, p. 431-442, 2003.

ÔSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microeletroforetic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PIERCE, B. A. **Genética – Um enfoque conceitual**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

PIETRAS, K.; HANAHAN, D. A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose “chemo-switch” regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 5, p. 939-952, 2005.

PINTO, L. F. R.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra, 2003. p. 29-44.

REED, S. I. Control of the G1/S transition. **Cancer Surveys**, v. 29, p. 7-23, 1997.

ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R. Fundamentals of cosmetic product safety testing. **Cosmetics and Toiletries**, v. 111, n. 10, p. 79-88, 1996.

ROTH, G. J.; HECKEL, A.; COLBATZKY, F.; HANDSCHUH, S.; KLEY, J.; LEHMANN-LINTZ, T.; LOTZ, R.; TONTSCH-GRUNT, U.; WALTER, R.; HILBERG, F. Design, synthesis, and evaluation of indolinones as triple angiokinase inhibitors and the discovery of a highly specific 6-methoxycarbonyl-substituted indolinone (BIBF 1120). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4466-4480, 2009.

RUAS, M.; PETERS, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1378, n. 2, p. 155-177, 1998.

RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: HANAWALT, P. C.; FRIEDBERG, E. C.; FOX, C. F. (Eds.). **DNA Repair Mechanisms**, New York: Academic Press, p. 465-468, 1978.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 544, n. 2-3, p. 99-106, 2003.

SCHERLIESS, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v.411, n. 1-2, p. 98-105, 2011.

SHAN, J.; ZHAO, W.; GU, W. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. **Molecular Cell**, v. 36, n. 3, p. 469-476, 2009.

SHAWVER, L. K.; SLAMON, D.; ULLRICH, A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **Cancer Cell**, v. 1, n. 2, p. 117-123, 2002.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SONG, J.; SU, H.; ZHOU, Y. Y.; GUO, L. L. Prognostic value of survivin expression in breast cancer patients: a meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 34, n. 4, p. 2053-2062, 2013.

STELLRECHT, C. M.; GANDHI, V. MET receptor tyrosine kinase as a therapeutic anticancer target. **Cancer Letters**, v. 280, n. 1, p. 1-14, 2009.

SUN, L.; TRAN, N.; TANG, F.; APP, H.; HIRTH, P.; MCMAHON, G.; TANG, C. Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: a novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosine kinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 14, p. 2588-2603, 1998.

SURGET, S.; KHOURY, M. P.; BOURDON, J. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. **OncoTargets and Therapy**, v. 7, p. 57-68, 2014.

SWEENEY, C. J.; CHIOREAN, E. G.; VERSCHRAEGEN, C. F.; LEE, F. C.; JONES, S.; ROYCE, M.; TYE, L.; LIAU, K. F.; BELLO, A.; CHAO, R.; BURRIS, H. A. A phase I study of sunitinib plus capecitabine in patients with advanced solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 29, p. 4513-4520, 2010.

TABY, R.; ISSA, J. P. Cancer epigenetics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 6, p. 376-392, 2010.

TAMM, I.; WANG, Y.; SAUSVILLE, E.; SCUDIERO, D. A.; VIGNA, N.; OLTERS DORF, T.; REED, J. C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. **Cancer Research**, v. 58, n. 23, p. 5315-5320, 1998.

TANEJA, P. Control of cellular physiology by transcription factors E2F and their roles in carcinogenesis. In: YOSHIDA, K. (Ed.). **Control of cellular physiology by E2F transcription factors**. Kerala: Research Signpost, 2008. p. 179-197.

TRUSOLINO, L.; BERTOTTI, A.; COMOGLIO, P. M. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 834-848, 2010.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Bio Techniques**, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.

VASSILEV, L. T.; VU, B. T.; GRAVES, B.; CARVAJAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.; LIU, E. A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. **Science**, v. 303, n.5659, p. 844-848, 2004.

VENNSTROM, B.; SHEINESS, D.; ZABIELSKI, J.; BISHOP, J. M. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. **Journal of Virology**, v. 42, n. 3, p. 773-779, 1982.

VILLELA, I.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.; SILVEIRA, J. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p. 147-161, 2003.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v.10, n. 8, p. 789-799, 2004.

VOLM, M.; KOOMAG, I. R.; MATTERN, J.; STAMMLER, G. Cyclin A is associated with an unfavourable outcome in patients with non-small-cell lung carcinomas. **British Journal of Cancer**, v. 75, n. 12, p. 1774-1778, 1997.

WALSANGIKAR, S. D.; KULKARNI, A. S. Angiogenesis inhibitors targets for cancer treatment. **International Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 52-60, 2013.

WANG, C.; LISANTI, M. P.; LIAO, D. J. Reviewing once more the c-myc and Ras collaboration converging at the cyclin D1-CDK4 complex and challenging basic concepts of cancer biology. **Cell Cycle**, v. 10, n. 1, p. 57-67, 2011.

WEI, M. C.; ZONG, W. X.; CHENG, E. H.; LINDSTEN, T.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; ROSS, A. J.; ROTH, K. A.; MACGREGOR, G. R.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v. 292, n. 5517, p. 727-730, 2001.

WENTZEL, J. F.; GOUWS, C.; HUYSAMEN, C.; DYK, E.; KOEKEMOER, G.; PRETORIUS, P. J. Assessing the DNA methylation status of single cells with comet assay. **Analytical Biochemistry**, v. 400, n. 2, p. 190-194, 2010.

WONG, J. V.; DONG, P.; NEVINS, J. R.; MATHEY-PREVOT, B.; YOU, L. Network calisthenics: control of E2F dynamics in cell cycle entry. **Cell Cycle**, v. 10, n. 18, p. 3086-3094, 2011.

YANG, R.; MOROSETTI, R.; KOEFFLER, H. P. Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines. **Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 913-920, 1997.

YI, C. H.; PAN, H.; SEEBACHER, J.; JANG, I. H.; HYBERTS, S. G.; HEFFRON, G. J.; VANDER HEIDEN, M. G.; YANG, R.; LI, F.; LOCASALE, J. W.; SHARFI, H.; ZHAI, B.; RODRIGUEZ-MIAS, R.; LUITHARDT, H.; CANTLEY, L. C.; DALEY, G. Q.; ASARA, J. M.; GYGI, S. P.; WAGNER, G.; LIU, C. F.; YUAN, J. Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. **Cell**, v. 146, n. 4, p. 607-620, 2011.

YU, B. D.; BECKER-HAPAK, M.; SNYDER, E. L.; VOUIJS, M.; DENICOURT, C.; DOWDY, D. F. Distinct and nonoverlapping roles for pRb and cyclin D: cyclin-dependent kinases 4/6 activity in melanocyte survival. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 100, n. 25, p. 14881-14886, 2003.

ZORZETTO, M.; FERRARI, S.; SARACINO, L.; INGHILLERI, S.; STELLA, G. M. MET genetic lesions in non-small-cell lung cancer: pharmacological and clinical implications. **Translational Lung Cancer Research**, v.1, n. 3, p.194-207, 2012.

ZOU, H.; ZHANG, L.; OUYANG, J.; GIULIANOTTI, M. A.; YU, Y. Synthesis and biological evaluation of 2-indolinone derivatives as potential antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5970-5977, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A

ENSAIO DO COMETA

Compostos químicos

Benzo[a]pireno

Benzo[a]pireno (B[a]P) é um pré-carcinógeno encontrado na fumaça do cigarro, alimentos cozidos e em vários gases de combustão. B[a]P é biotransformado por inúmeros passos enzimáticos para formas carcinogênicas finais, que são intermediários eletrofílicos altamente reativos. O maior carcinógeno intermediário de B[a]P é (±)-anti-benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), que forma aductos de DNA por ligação covalente (SHIIZAKI; KAWANISHI; YAGI, 2013).

O B[a]P ($C_{20}H_{12}$; Sigma-Aldrich) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, $(CH_3)_2SO$ – Merck) para obtenção de uma solução-mãe concentrada de 5 mg/mL mantida a $-20^\circ C$ e na ausência de luz. A partir desta, foi diluída novamente em DMSO para uma concentração final em cultura de $3,78 \mu g/mL$ para utilização como controle positivo no ensaio do cometa, e $5,04 \mu g/mL$ para utilização no ensaio do micronúcleo. A concentração final de DMSO não excedeu 1% em meio de cultura.

METODOLOGIA

Para a realização do ensaio do cometa foi utilizada a versão alcalina de acordo com a metodologia proposta por Singh et al. (1988), com modificações. Este ensaio foi realizado em triplicata técnica, onde $1,5 \times 10^5$ células foram cultivadas em 2 mL de meio de cultura em placas de 12 poços submetidas a incubação inicial para estabilização por 24 horas a $37^\circ C$ e 5% de CO_2 .

Decorrido o tempo de estabilização, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com 1 mL de PBS, e então adicionados tratamentos em 2 mL de meio sem soro bovino fetal. Cada triplicata foi tratada com as concentrações de 8, 16 e $24 \mu g/mL$ de indolin-3-ona (definidas previamente pelo ensaio do MTT), $3,78 \mu g/mL$ de B[a]P como controle positivo, PBS como controle negativo e metanol

(<1%) como controle de solvente por 24 horas. Após este período as células foram lavadas com PBS para a retirada dos tratamentos e tripsinizada com 300 µL de tripsina (solução uso 0,0625%, Gibco – Invitrogen) para seu desprendimento total.

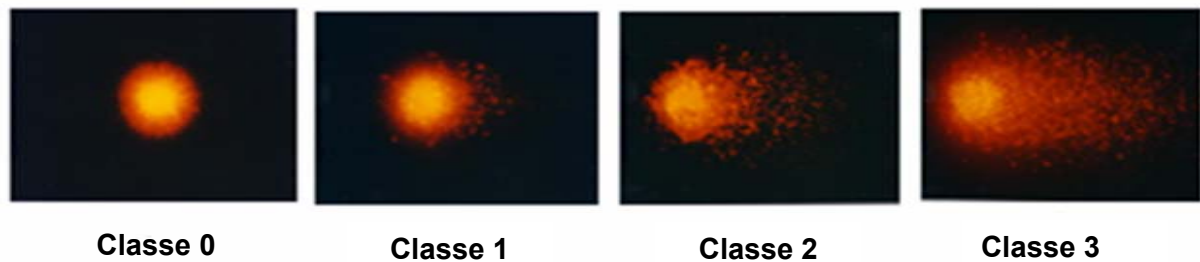
As suspensões celulares foram transferidas para microtubos onde foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O excesso do sobrenadante foi retirado, deixando-se aproximadamente 0,1 mL em cada tubo e o sedimento celular ressuspenso. Desta suspensão uma alíquota de 20 µL foi homogeneizada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (Gibco – Life Technologies) 0,5% que foi aplicada em lâminas preparadas previamente com agarose de ponto de fusão normal (Invitrogen – Life Technologies) 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas 24 x 50 mm e mantidas a 4° C por 20 minutos. Em seguida as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas mantidas 90 minutos em solução de lise de membrana (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 10% DMSO, 1% Triton-X, pH 10) a 4°C.

Após a lise as lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas por 20 minutos em tampão de eletroforese (200 mM EDTA, 10 N NaOH, pH 13) para a desnaturação do DNA e então submetidas à eletroforese horizontal (0,78V/cm; 300mA) por igual período a uma temperatura aproximada de 4°C na ausência de luz. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com solução de neutralização (Tris 0,4M, pH 7,5), por 5 minutos, repetindo-se três vezes esta etapa, e fixadas com etanol absoluto por 5 minutos.

A análise das lâminas foi feita em microscópio de fluorescência (Nikon) com objetiva de 40X com filtro de excitação com comprimento de onda de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm. Para isso foram coradas com 40 µL de Gel Red (Biotium) e cobertas com lamínula.

Conforme descrito por Kobayashi et al. (1995), foram seguidos os seguintes critérios visuais para a avaliação do tamanho da cauda dos cometas: classe 0, nucleoides com ausência de cauda; classe 1, cauda menor que o diâmetro da cabeça do nucleóide; classe 2, nucleoides com cauda de tamanho médio, entre 1 e 2 vezes o diâmetro da cabeça; classe 3, nucleoides com cauda longa, com o comprimento superior a 2 vezes o diâmetro da cabeça (Figura 11).

Figura 11 – Classes de danos utilizadas para análise de células. Aumento 600X. Fonte: Vanzela (2006).



A partir dos dados obtidos foram calculados os escores de acordo com a seguinte equação descrita por Manoharan e Banerjee (1985): $\text{escore} = \frac{n(0) \times 0 + n(1) \times 1 + n(2) \times 2 + n(3) \times 3}{N}$, onde, $n(0)$ é o número de nucleoides classe 0 encontrados; $n(1)$, o número de nucleoides classe 1; $n(2)$, o número de nucleoides classe 2; $n(3)$, o número de nucleoides classe 3 e N o número total de nucleoides avaliados. Para a análise citológica foram selecionadas ao acaso 100 células não sobrepostas por lâmina para cada tratamento.

A frequência de danos foi calculada a partir da seguinte equação: $\text{frequência de danos} = \frac{n(1) + n(2) + n(3)}{N}$, onde $n(1)$ é o total de células com dano classe 1 encontradas; $n(2)$, o total de células com dano classe 2; e $n(3)$, o total de células com dano classe 3 e N o número total de células avaliadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio deste ensaio foi possível detectar que a indolin-3-ona foi genotóxica nas concentrações de 16 e 24 $\mu\text{g/mL}$ em células HepG2 no tempo de 24 horas de tratamento, ou seja, os escores médios de danos para estas duas concentrações foram estatisticamente diferentes do obtido para o grupo controle negativo ($p < 0,01$). O solvente não apresentou atividade genotóxica quando comparado ao grupo controle negativo (Tabela 2 e Figura 12).

A versatilidade de aplicações do ensaio do cometa indica a sua utilidade no tratamento de um vasto número de questões em medicina, biologia e toxicologia. Esta técnica se mostra interessante, devido à sensibilidade que tem mostrado para detecção de quebras de fitas no DNA ao nível de célula única (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

Não há estudos na literatura que avaliem a genotoxicidade de compostos do grupo das indolinonas. Neste estudo, o ensaio do cometa foi utilizado para detectar possíveis danos causados ao material genético de células HepG2 expostas à indolin-3-ona. Esta apresentou atividade genotóxica nas duas maiores concentrações testadas (16 e 24 µg/mL) para o tempo de 24 horas de exposição.

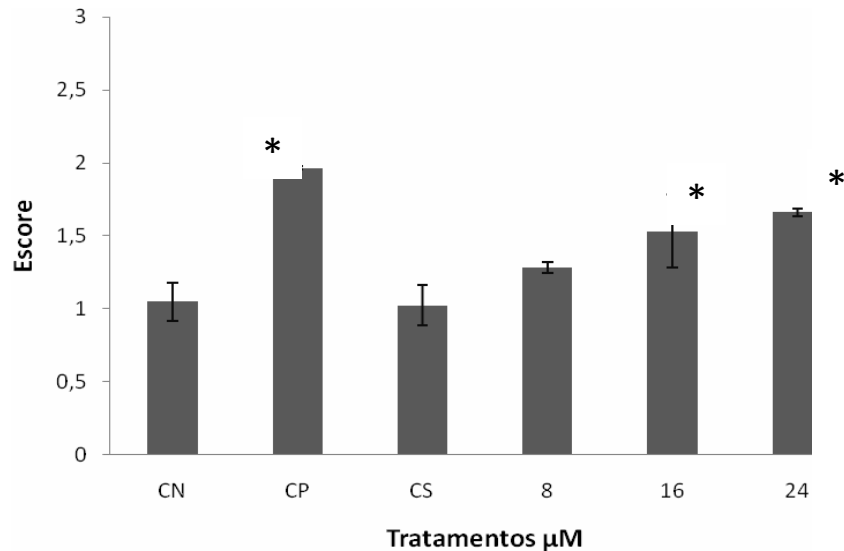
Este resultado, somado aos dados de mutagenicidade (teste do micronúcleo) que ainda será realizado, vai indicar se os danos encontrados pelo ensaio do cometa serão fixados em lesões permanentes, detectada pela presença de micronúcleos, ou se serão reparados pelo sistema de reparo de DNA da célula. Uma evidência de que os danos encontrados nas células HepG2 pelo ensaio do cometa, possivelmente sejam reparados, é de que os danos se concentraram nas classes 1 e 2, sugerindo um efeito genotóxico passível de reparo.

Tabela 2 – Valores médios da frequência de células com danos no DNA e distribuição das classes de danos obtidos no ensaio do cometa em células HepG2 após 24 horas de tratamento com indolin-3-ona.

Tratamentos (µg/mL)	Níveis de Danos (X±DP)				Células com dano no DNA (X±DP)	
	0	1	2	3		
PBS	32,33±8,33	37,66±10,5	23,00±5,57	7,00±2,65	67,66±8,33	
B[a]P 3,78	8,66±3,215	24,33±4,62	29,00±7,00	38,00±4,00	91,33±3,21*	
MeOH <1%	44,33±7,50	26,00±3,60	12,66±3,05	17,00±3,46	55,66±7,51	
Indolin-3- ona	8	28,00±13,1	35,66±14,6	16,33±8,39	20,00±9,85	72,00±13,07
	16	20,66±1,53	28,33±10,1	28,33±2,08	22,66±12,7	79,33±1,53
	24	11,66±3,21	27,33±1,53	43,66±8,62	17,33±5,03	88,33±3,21*

X ± DP = média ± desvio padrão; PBS (tampão fosfato salino) = controle negativo; B[a]P = controle positivo; MeOH = controle de solvente. *Estatisticamente diferente do CS ao p<0.05.

Figura 12 – Escores de danos obtidos pelo ensaio do cometa em células HepG2 após tratamento de 24 horas com indolin-3-ona. *Estatisticamente diferente do CS ao $p < 0.05$. ANOVA seguida de Dunnet. CN = controle negativo, PBS (tampão fosfato salino); CP = controle positivo, B[a]P 3,78 $\mu\text{g/mL}$; CS = controle de solvente, <1% de metanol.



REFERÊNCIAS

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v.339, n. 1, p. 37-59, 1995.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHY, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single gel electrophoresis assay. **MMS Communications**. v. 3, p. 103-115, 1995.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. b-Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**, v. 9, n. 9, p. 783-789, 1985.

SHIIZAKI, K.; KAWANISHI, M.; YAGI, T. Dioxin suppresses benzo[a]pyrene-induced mutations and DNA adduct formation through cytochrome P450 1A1 induction and (\pm)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide inactivation in human hepatoma cells. **Mutation Research**, v.750, n. 1-2, p. 77-85, 2013.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v.175, n. 1, p. 184-191, 1988.

VANZELA, T. P. **Efeitos genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel de óleo diesel em uma espécie de peixe neotropical**. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.