



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATÁLIA APARECIDA DE PAULA

**“CITOTOXICIDADE, CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO,
INDUÇÃO DE APOPTOSE E GENOTOXICIDADE DO
NICORANDIL E DA N-(BETA-HIDROXIETIL) NICOTINAMIDA
EM CULTURA DE CÉLULAS RENAIIS (786-O)”**

Londrina
2011



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

NATÁLIA APARECIDA DE PAULA

**“CITOTOXICIDADE, CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO,
INDUÇÃO DE APOPTOSE E GENOTOXICIDADE DO
NICORANDIL E DA N-(BETA-HIDROXIETIL) NICOTINAMIDA
EM CULTURA DE CÉLULAS RENAIIS (786-O)”**

NATÁLIA APARECIDA DE PAULA

**“CITOTOXICIDADE, CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO,
INDUÇÃO DE APOPTOSE E GENOTOXICIDADE DO
NICORANDIL E DA N-(BETA-HIDROXIETIL) NICOTINAMIDA
EM CULTURA DE CÉLULAS RENAIIS (786-O)”**

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

Orientador: Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2011

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P329c Paula, Natália Aparecida de.
Citotoxicidade, cinética de proliferação, indução de apoptose e genotoxicidade do nicorandil e da N-(beta-hidroxietil) nicotinamida em cultura de células renais (786-O) / Natália Aparecida de Paula. – Londrina, 2011.
65 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Células cancerosas – Rins – Teses. 2. Células cancerosas – Efeito citotóxico – Teses. 3. Células cancerosas – Proliferação – Teses. 4. Apoptose – Indução – Teses. 5. Células – Cultura e meios de cultura – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e

NATÁLIA APARECIDA DE PAULA

**“CITOTOXICIDADE, CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO, INDUÇÃO DE
APOPTOSE E GENOTOXICIDADE DO NICORANDIL E DA N-(BETA-
HIDROXIETIL) NICOTINAMIDA
EM CULTURA DE CÉLULAS RENAIIS (786-O)”**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Edson Luis Maistro
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 fevereiro de 2011.

Dedico à mamãe, papai e a Pri,
Meu porto seguro.
E estímulo para perseverança.

“Não se irrite por causa dos maus nem tenha inveja dos injustos,
eles são como erva: secam depressa...
Confie em Javé e pratique o bem, habite na terra e viva tranqüilo.
Coloque em Javé o seu prazer e ele dará o que seu coração deseja.
Entregue seu caminho a Ele, nele confie, e Ele agirá...”
(Salmo 37, Bíblia)

AGRADECIMENTOS

À Deus que tudo me provê, no momento apropriado e da maneira adequada. E que me permitiu passar estes anos em Londrina e concluir este trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani por manter as portas do laboratório abertas, desde a graduação, para que fosse possível a realização deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, e seus docentes, pela oportunidade e ensinamentos que contribuíram para minha formação.

Ao técnico Dario por contribuir para a organização do laboratório e melhor desempenho de minhas atividades. E a secretária Sueli que sempre esteve disposta e alegre em nos ajudar.

À Carolina do Laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres, que também contribui neste trabalho.

Às instituições que contribuíram financeiramente para a realização deste trabalho: CAPES/CNPq e Fundação Araucária.

Aos grandes amigos Andressa e Diogo que se tornaram minha família, durante estes 6 anos, partilhando momentos de dúvidas e incertezas, dias de desespero, experimentos intermináveis, dias de muitas risadas e muita comida, meu parque de diversões! Fazendo de meus dias uma grande alegria. Vocês se tornando meus amigos no maior dos significados da amizade, pessoas que se completam, se aceitam, vivem na mesma sintonia, onde apenas um olhar revela um pensamento. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

As amigas e companheiras de laboratório Simone, Gláucia, Juliana, Marcela, Sandra, Eliane, Daniele, Lillian, Ana Livia, Priscila, e todos que mesmo em período mais curto, fizeram do laboratório um ambiente tão agradável. Obrigada pelos ensinamentos e ajuda nos experimentos. E pelos divertidos ‘motiores’, onde partilhávamos quitutes e muitas risadas.

À minha família por confiar, e me dar o amor e apoio necessários.

Por todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho e em minha trajetória aqui.

Muito Obrigada, que estejam sempre na paz e na alegria!!

DE PAULA, Natália Aparecida. **Citotoxicidade, cinética de proliferação, indução de apoptose e genotoxicidade do nicorandil e da N-(beta-hidroxietil) nicotinamida em cultura de células renais (786-O)**. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina-PR, 2011.

RESUMO

O nicorandil, um doador de óxido nítrico (NO) e ativador de canal de potássio ATP sensível (K_{ATP}), utilizado no tratamento da angina, tem como molécula precursora a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida, não liberadora de NO. O nicorandil influencia a proliferação celular excessiva na disfunção renal, e a apoptose no tecido cardíaco pós isquemia. Moléculas que apresentam caráter regulatório em processos de crescimento e morte celular são importantes na terapia de doenças com alteração nesses processos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade do nicorandil e avaliar sua influência no crescimento celular, na apoptose e na indução de danos no DNA de células de carcinoma renal (786-O). Para verificar a influência do NO liberado foi também avaliada a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida, cuja estrutura é diferenciada apenas pela ausência do radical NO_2 . No ensaio de citotoxicidade MTT, as moléculas apresentaram citotoxicidade a partir de 24h em concentrações diferentes, o nicorandil em 2000 $\mu\text{g/mL}$ e a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida em 3000 $\mu\text{g/mL}$. Nos demais ensaios nicorandil e a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida foram testados nas concentrações de 20, 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ e não apresentaram resultados diferentes entre si. Não foram genotóxicas no ensaio do cometa e não alteraram o crescimento celular. Na avaliação morfológica da apoptose não houve alteração, e a expressão dos genes da via apoptótica testados não foi alterada. Concluímos que o nicorandil é citotóxico apenas em altas concentrações, e não altera os outros processos testados nas células renais e a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida concorda em todos os resultados com o nicorandil, exceto pela sua citotoxicidade ser menor, provavelmente pela ausência de NO.

Palavras Chave: Nicorandil. N-(beta-hidroxietil) nicotinamida. Proliferação celular. Apoptose. Células 786-O.

DE PAULA, Natália Aparecida. **Cytotoxicity, proliferation kinetics, induction of apoptosis and genotoxicity of nicorandil and N-(beta-hydroxyethyl) nicotinamide in renal cell culture (786-O)**. 2011. 65f. Work of Dissertation (Master's Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina-PR, 2011.

ABSTRACT

Nicorandil, nitric oxide (NO) donor and opener of ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}), is used to treat angina, have as precursor molecule N-(beta-hydroxyethyl) nicotinamide, not donor of NO. Nicorandil influence the excessive cell proliferation in renal dysfunction, and apoptosis in cardiac tissue after the ischemia. Molecules that show character regulatory in cellular processes such as growth and death cell, present important role in the therapy of diseases with alteration in these processes. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of nicorandil and if it influences the cell growth, apoptosis and cause DNA damage in renal cell carcinoma (786-O), and to check the influence of NO release was also evaluated the N-(beta-hydroxyethyl) nicotinamide. In the MTT cytotoxicity assay, cytotoxic molecules from 24h in concentrations different, the nicorandil in 2000 μ g/mL and the N-(beta-hydroxyethyl) nicotinamida in 3000 μ g/mL. In the other trials nicorandil and N-(beta-hydroxyethyl) nicotinamida were tested at concentrations 20, 100 and 500 μ g/mL and not showed different results with each other. Were not genotoxic in the comet assay and did not affect cell growth. In the evaluation morphology of apoptosis no has changed, and the expression of the genes tested too was not change. We conclude that nicorandil is cytotoxic only at high concentrations, and not changed the other processes tested in kidney cells and N-(beta-hydroxyethyl) nicotinamide agree in all these results with nicorandil, except for its cytotoxicity be lower, probably due to the absence of NO.

Keywords: Nicorandil. N-(beta-hydroxyethyl) nicotinamide. Cell proliferation. Apoptosis. Cell 786-O.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (a) e do nicorandil (b).....	16
Figura 2 - Síntese do nicorandil a partir do ácido nicotínico	17
Figura 3 - Imagem da análise morfológica de apoptose. À esquerda padrão de célula normal, à direita padrão de célula apoptótica. Análise em microscópio de fluorescência em objetiva de 40x.....	23

ARTIGO

Figura 1 - Viabilidade Celular Média (%) obtida no teste de citotoxicidade MTT. Células 786-O tratadas com (a) nicorandil e (b) N-(beta-hidroxietil) nicotinamida por 24, 48 e 72h. ** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$. Considerando Controle (DMSO) viabilidade 100%	38
Figura 2 - Concentração média de Óxido nítrico (NO) no meio de cultura com células 786-O, tratadas com nicorandil (2-NN) ou com N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1). Dosagem feita após quatro tempos de exposição (1, 12, 24 e 48h). Controle 0,25% DMSO. *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($P < 0.001$).	39
Figura 3 - Concentração média de óxido nítrico (NO) liberado no meio de cultura na ausência e presença das células 786-O, tratadas com nicorandil. Dosagem feita após quatro tempos de exposição (1, 12, 24 e 48h). * Diferença estatisticamente ($P < 0.05$) ausência vs. presença de célula.....	39
Figura 4 - Curva de cinética de proliferação das células 786-O tratadas com (a) nicorandil (2-NN) e (b) N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1). Obtida com os valores da contagem celular na câmara de <i>Neubauer</i> , após os tempos de tratamento 24, 48, 72 e 96h. (Controle 0,25%DMSO). ** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$	40
Figura 5 - Número médio de células apoptóticas na cultura de célula 786-O tratada com nicorandil e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1) por 24h (500 células analisadas por tratamento). Controle 0,25% DMSO, Camptotecina 0 $\mu\text{g/mL}$. ** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$	41

- Figura 6** - Expressão relativa dos genes *CASP8*, *CASP9*, *BCL-XL* e *BIRC5*, avaliada por RT-PCR em tempo real, das células 786-O após 12 horas de tratamento com nicorandil 500 µg/mL (2-NN 500), N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL (L1 500) e Controle (0,25%DMSO). Os dados foram normalizados com o gene *GAPDH*. 42
- Figura 7** - Expressão relativa dos genes *CASP8*, *CASP9*, *BCL-XL* e *BIRC5* por RT-PCR em tempo real, comparando a expressão entre os dois tratamentos. Células 786-O tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL (2-NN 500) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL (L1 500). Expressão relativa do controle = 1. Os dados foram normalizados com o gene *GAPDH*. 43
- Figura 8** - Escore médio dos cometas observados nas células 786-O, após 3 horas de tratamento com nicorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1). (100 células analisadas por tratamento) ** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$ 58

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR em Tempo Real.	36
Tabela 2 - Número médio de células com dano, distribuição nas classes de cometa e escore médio dos cometas, referente às células tratadas com nicorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1), por 3h. (Média ± Desvio Padrão).	41
Tabela 3 - Valores médios das absorvâncias obtidas no teste de citotoxicidade. Células 786-O tratadas com nicorandil (2-NN) por 24, 48 e 72h.	58
Tabela 4 - Valores médios das absorvâncias obtidas no teste de citotoxicidade. Células 786-O tratados com N-(beta-hidroxietil) nicotinamida por 24, 48 e 72h.	59
Tabela 5 - Viabilidade Celular em porcentagem (%) calculada a partir das absorvâncias obtida pelo teste de citotoxicidade MTT. Células 786-O tratadas com o nicorandil (2-NN) por 24, 48 e 72h. Considerando controle 100%.	59
Tabela 6 - Viabilidade Celular em porcentagem (%) calculada a partir das absorvâncias obtida pelo teste de citotoxicidade MTT. Células 786-O tratadas com N-(beta-hidroxietil) nicotinamida por 24, 48 e 72h. Considerando controle 100%.	60
Tabela 7 - Liberação média de NO na cultura de célula 786-O tratadas com nicorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1), nos tempos de exposição de 1, 12, 24 e 48h.	60
Tabela 8 - Dosagem de NO em meio de cultura. Alíquotas para dosagem retirada nos tempos 1, 12, 24 e 48h de exposição. ($\mu\text{M} \pm$ desvio padrão).	61
Tabela 9 - Número médio de células obtidas na contagem em câmara de <i>Neubauer</i> . Células 786-O tratadas com nicorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1), nos tempos de tratamento 24, 48, 72 e 96h. (Número médio de células $\times 10^4 \pm$ desvio padrão),	61
Tabela 10 - Avaliação de Indução de Apoptose, das células 786-O tratadas com icorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1) por 24h.	62

Tabela 11 -	Dados para o cálculo da Razão referente à expressão relativa do gene <i>CASP8</i> de células 786-O, tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL. Conforme método de Pfaffl, 2001. <i>GAPDH</i> = gene normalizador.....	62
Tabela 12 -	Dados para o cálculo da Razão referente à expressão relativa do gene <i>CASP9</i> de células 786-O, tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL. Conforme método de Pfaffl, 2001. <i>GAPDH</i> = gene normalizador.....	63
Tabela 13 -	Dados para o cálculo da Razão referente à expressão relativa do gene <i>BCL-XL</i> de células 786-O, tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL. Conforme método de Pfaffl, 2001. <i>GAPDH</i> = gene normalizador.....	64
Tabela 14 -	Dados para o cálculo da Razão referente à expressão relativa do gene <i>BIRC5</i> de células 786-O, tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL. Conforme método de Pfaffl, 2001. <i>GAPDH</i> = gene normalizador.....	65
Tabela15 -	Dados Farmacológicos do nicorandil	65

LISTA DE ABREVIATURAS

2-NN	Éster nitrato de N-(beta-hidroxietil) nicotinamida
786-O	células de carcinoma renal humano
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
Ca²⁺	íon Cálcio
cDNA	DNA complementar
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas
CuSO₄	Sulfato de cobre
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DNIS	dinitrato de isosorbida
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
Doxo	Doxorrubicina
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase
GC	guanilato ciclase solúvel
GMPc	guanosina-3',5'-monofosfato cíclico
GST	glutathione S-transferase
GTP	guanosina-5'-trifosfato
H₂SO₄	ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
IPA	proteínas inibidoras de apoptose
ISMN	mononitrato-5 de isossorbida
K⁺	íon potássio
K_{ATP}	Canal de Potássio ATP sensível
K_{ca}	Canal de Potássio dependente de Ca ²⁺
K_{ir}	Canal de potássio <i>inward rectifier</i>
K_v	Canal de potássio dependente da voltagem
L1	N-(beta-hidroxietil) nicotinamida

LMP	low melting point
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NaCl	Cloreto de Sódio
NaNO₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido Nítrico
NO₂	radical nitrito
NOS	isoenzimas NO-sintase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação da Polimerase em cadeia
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
RNOS	espécies reactivas de oxigênio
RT-PCR	Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase
SBF	soro bovino fetal
SCGE	<i>single cell gel electrophoresis</i>
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
TGF-β	fator crescimento transformador β
TNG	nitroglicerina ou trinitrato de glicerina
TNPE	tetranitrato de pentaeritritila
XO	xantina oxidase
ZnSO₄	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 ARTIGO	27
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

O nicorandil (éster nitrato de N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida) (Figura 01.b) é usado, com grande eficácia, no tratamento de cardiopatias, hipertensão e angina pectoris (dor causada pelo fluxo sanguíneo deficiente no músculo cardíaco).

Possui habilidade de hiperpolarizar a membrana das células musculares e ser um potente vasodilatador coronariano (FRYDMAN, 1992). O nicorandil permite a vasodilatação coronariana e periférica, e diminui a pressão na entrada e saída (*preload* e *afterload*) do fluxo sanguíneo no coração e tem sido avaliado quanto a capacidade de produzir um pré-condicionamento isquêmico (estado capaz de reduzir os danos causados pela isquemia-reperfusão) (EECKHOUT, 2003; CARREIRA *et al.*, 2008). Possui duas características principais e muito estudadas, doador de óxido nítrico (NO) e ativador de canal de potássio ATP-sensível (K_{ATP}) (SIMPSON *et al.*, 2004).

O nicorandil tem como molécula precursora na sua síntese a N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida (Figura 01.a) que não possui o radical nitrito (NO_2^-), portanto não é doadora de NO. O nicorandil (Figura 01.b) é uma molécula derivada da nicotinamida, e o seu processo de síntese partindo da molécula de ácido nicotínico, possui algumas etapas (Figura 02), onde sucessivas reações químicas geram a molécula precursora N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida (Figura 01.a) a qual recebe a adição do radical NO_2 gerando o Éster nitrato de N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida.

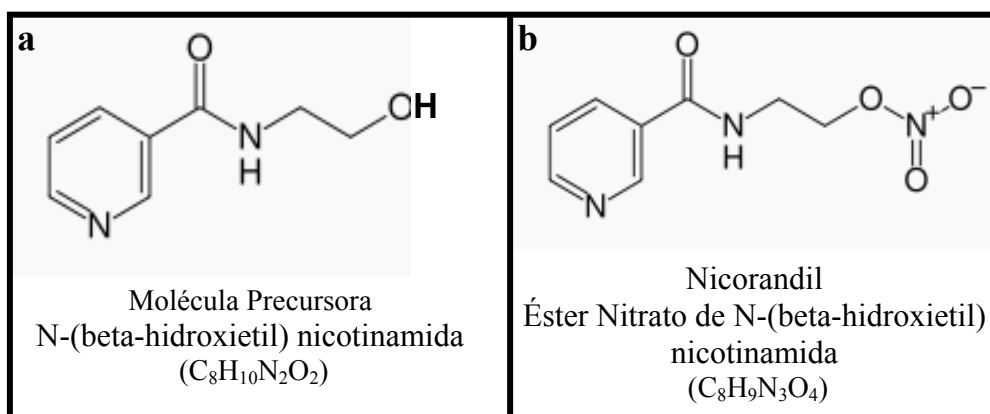


Figura 1 - Estrutura química da N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida (a) e do nicorandil (b).

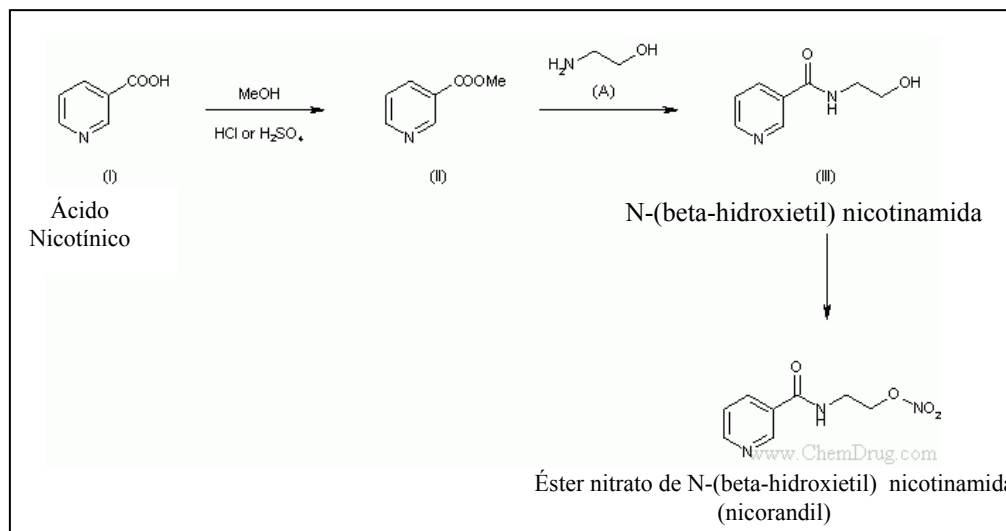


Figura 2 - Síntese do nicorandil a partir do ácido nicotínico.

Fonte: http://www.chemdrug.com/databases/8_0_ebjtyefqjfgtubs.html

Quimicamente o nicorandil pertence ao grupo dos nitratos orgânicos (RONO_2), por possuir o radical nitrato (HIREMATH *et al.*, 2010). Esse tipo de molécula estimula a formação de GMPc (guanosina-3',5'-monofosfato cíclico) nas células da musculatura lisa, o que promove o relaxamento da musculatura dos vasos; e a abertura de canais K_{ATP} gerando hiperpolarização da membrana celular que promove a dilatação de arteríolas periféricas e coronárias. A porção NO_2 da estrutura química do nicorandil desempenha papel importante nesses mecanismos (KINOSHITA *et al.*, 1990; MARKHAM *et al.*, 2000).

Os nitratos orgânicos são ésteres do ácido nítrico de álcoois mono ou poli-hidroxilados. A maioria dos nitratos é pouco solúvel em água e apresenta boa estabilidade em condições neutras ou fracamente ácidas. Quando corretamente armazenados e protegidos da luz, podem ser mantidos em etanol ou DMSO (dimetilsulfóxido) por meses e até anos (HONEYMAN *et al.*, 1957; WANG *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2005). Entretanto, sob condições fortemente básicas eles podem sofrer hidrólise, formando nitrato e o álcool correspondente, ou então sofrer uma alfa ou beta-eliminação, dando origem ao aldeído ou nitrito, respectivamente (BAKER *et al.* 1952; CAPELLOS *et al.*, 1984).

Os principais efeitos biológicos dos nitratos são atribuídos à formação de NO (WANG *et al.*, 2002), e dentre os nitratos orgânicos doadores de NO como o nicorandil, incluem a importante e bem estudada nitroglicerina ou trinitrato de glicerina (TNG) e outros como o dinitrato de isosorbida (DNIS) e o tetranitrato de pentaeritritila (TNPE) (BARRETO *et al.*, 2005).

Os doadores de NO, dependendo de sua estrutura química, liberam o radical por três mecanismos principais: doando NO espontaneamente, por reações térmicas ou fotoquímicas (S-nitrosotióis, diazeniumdiolatos, oximas); reações químicas com ácidos, álcalis, metal e tíois (nitratos orgânicos, nitritos e sindnoniminas) (FEELISCH *et al.*, 1989); e oxidação enzimática (N-hidroxi guanidinas, nitratos orgânicos) (CAI *et al.*, 2005).

Assim, a liberação de NO pelos nitratos orgânicos (classe que se inclui o nicorandil) pode ocorrer por dois mecanismos diferentes, via enzimática ou por reações químicas (não-enzimática).

Pela via enzimática (SETH *et al.*, 1993), podem estar envolvidas as enzimas glutathione S-transferase (GST) e xantina oxidase (XO), ou enzimas do complexo citocromo P450. Enquanto que, pela via não enzimática (CHONG *et al.*, 1991; HARRISON *et al.*, 1993), a redução se dá via espécies do tipo tíois, que se recombina formando dissulfetos. O aminoácido cisteína e seus derivados, como N-acetilcisteína, são importantes nesse processo e promovem a geração simultânea de NO. O principal metabolito nitrogenado gerado na decomposição dos nitratos é o íon nitrito (NO_2^-) (IGNARRO *et al.*, 1980; CHONG *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2005; MAYER *et al.*, 2008).

O radical NO liberado é essencial na atividade dos nitratos orgânicos como a nitroglicerina (TNG), tetranitrato de pentaeritritol (TNPE) e mononitrato-5 de isossorbida (ISMN), que são citados por inibirem a proliferação celular em tecido muscular liso dos vasos (OSINSKI *et al.*, 2001)

O NO é um radical livre que é endogenamente sintetizado a partir de L-arginina, por uma família de isoenzimas NO-sintase (NOS). Ele é um poderoso mensageiro biológico em uma variedade de tecidos, importante no sistema cardiovascular e nervoso, envolvido em uma série de funções fisiológicas, tais como vasodilatação, inibição da agregação plaquetária na microcirculação, regulação da neurotransmissão e na defesa natural do sistema imunológico (MONCADA *et al.*, 1991; LALA *et al.*, 1998).

O NO atua como uma molécula sinalizadora que se difunde facilmente pela membrana plasmática, e se liga à enzima guanilato ciclase solúvel (GC) o que catalisa a conversão de guanosina-5'-trifosfato (GTP) intracelular em guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc por sua vez atua como segundo mensageiro na transdução do sinal de diversas vias, como tônus e motilidade da musculatura lisa dos vasos, crescimento e diferenciação celular, fototransdução (transdução da energia luminosa para impulsos nervosos aferentes), manutenção da homeostase de fluidos e eletrólitos, e na apoptose (KRUMENACKER *et al.*, 2006; MUJOO *et al.*, 2010).

Vários estudos analisam os efeitos do NO nos processos de crescimento e morte celular, que são dependentes da sua concentração no microambiente, do tipo celular, duração da exposição e outros fatores (YIM *et al.*, 1993; DIMMELER *et al.*, 1997; MA *et al.*, 2007).

Além de atuar como um doador de NO e desempenhar atividade pela via do GMPc, o nicorandil gera efeitos importantes via ativação dos canais K_{ATP} . Os canais iônicos são formados por proteínas transmembrana e estão distribuídos na membrana das células, formam túneis de passagem seletiva a determinados íons, de forma a regularem o potencial elétrico dentro da célula.

Dentre os canais iônicos presentes nas células, estão os canais de potássio, que atuam na contração da musculatura vascular, quando abertos provocam a saída de K^+ do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva ($[K^+]_i > [K^+]_e$), causando hiperpolarização da membrana celular, conseqüentemente os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, se fecham diminuindo Ca^{2+} intracelular, efetuando a vasodilatação (SOBEY, 2001).

Há quatro diferentes tipos de canais de potássio: canal de potássio dependente da voltagem (Kv), dependente de Ca^{2+} (Kca), canais de potássio *inward rectifier* (Kir) e o dependente de ATP (ATP-sensível).

O canal de potássio ATP-sensível (K_{ATP}) foi primeiramente descrito no músculo cardíaco, por Noma (1983), e logo depois encontrado em vários outros locais como, células β do pâncreas, músculo esquelético, músculo liso, rim e também nas mitocôndrias (INOUE *et al.*, 1991; SEINO, 1999). O que caracteriza este tipo de canal é a sua sensibilidade à alteração na taxa ATP intracelular, o aumento da taxa de ATP/ADP promove o fechamento do canal K_{ATP} e o conseqüente influxo de Ca^{2+} . Esse mecanismo está bem estudado na regulação da secreção de insulina pelas células β (AGUILAR-BRYAN *et al.*, 1998; BAUKROWITZ *et al.*, 2000).

Através destes mecanismos (GMPc e K_{ATP}), além de atuar de forma eficiente no sistema hemodinâmico, promovendo o alívio dos sintomas da angina, o nicorandil se torna uma molécula importante na terapêutica de disfunções cardíacas por apresentar um efeito cardioprotetor e renoprotetor, independente do efeito vasodilatador.

O nicorandil apresenta proteção para o coração por atuar diretamente sobre as células da musculatura cardíaca, diminuindo a morte celular por apoptose observada nas patologias cardíacas (SATO *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2005).

O suprimento de oxigênio inadequado, recorrente da isquemia-reperfusão nas disfunções cardíacas, leva a alteração da carga iônica intracelular e gera um estado de

estresse oxidativo, prejudicando o funcionamento mitocondrial, alterando a permeabilidade da membrana e liberação de citocromo c, que desencadeiam o processo de apoptose (WEBSTER *et al.*, 1999; MACIEL *et al.*, 2001).

O nicorandil atua diminuindo a apoptose por ativar seletivamente canais mitoK_{ATP} (K_{ATP} mitocondriais), que inibe a despolarização da membrana mitocondrial e a consequente liberação de citocromo c para o citosol (SATO *et al.* 2000; NAGATA *et al.*, 2003; CARREIRA *et al.*, 2008).

Essa atividade foi observada por Akao e colaboradores (2002) em cultura de miócitos cardíacos de rato, tratada com nicorandil e exposta a condições de estresse oxidativo, o nicorandil inibiu a liberação de citocromo c nessas células. Em outro trabalho, ratos foram submetidos a condições de isquemia-reperfusão, os animais que receberam nicorandil tiveram uma proteção contra os danos pós-isquemia (LU *et al.*, 2006).

Segundo Nishikawa *et al.* (2006) o nicorandil inibiu apoptose em miócitos via GMPc, e por ativação de canal K_{ATP} inibiu a alteração de potencial de membrana, inibindo liberação de citocromo c. Nishikawa também observou que o nicorandil no estado de hipóxia influenciou a atividade e expressão de proteínas envolvidas no processo de apoptose, o nicorandil inibiu atividade da proteína caspase3, diminuiu a expressão de *BAX* e aumentou *BCL-2*.

As células cardíacas (cardiomiócitos) são extremamente diferenciadas e refratárias à entrada no ciclo celular, por esta característica a morte celular por apoptose resulta em uma redução no número de células e perda funcional progressiva do tecido. Assim a atividade protetora do nicorandil é de grande importância clínica nos casos de disfunção cardíaca.

Taimor e colaboradores (2000) utilizando outro doador de NO, *S*-nitroso-*N*-acetilpenicilamina em cardiomiócitos, observaram que o NO liberado induziu apoptose em condições normais de oxigenação, e que em condições de anóxia ocorreu a inibição da apoptose.

A disfunção renal pode ser a causa, conseqüência e/ou agravante de eventos cardiovasculares. Várias das desordens renais apresentam características como proliferação celular nos glomérulo, e proteinúria (um dos sinais de agravamento da doença renal) (ISHII *et al.*, 2007; JEFFERSON *et al.*, 2008).

Estudos mostram que o tratamento de cardiopatias com nicorandil melhora o prognóstico do paciente, uma vez que o nicorandil apresenta uma proteção no tecido renal por atuar diminuindo a excessiva proliferação das células mesangiais dos glomérulos,

diminuindo a proteinúria (SEGAWA *et al.*, 2001; SUDO *et al.*, 2009). Porém, um trabalho de Ziche *et al.* (1994) demonstrou que o doador de NO nitroprussiato de sódio, aumentou o número de células endoteliais, participando dos eventos de angiogênese.

É relatado que o nicorandil pode atuar inibindo a proliferação celular pela diminuição da expressão de TGF- β (fator crescimento transformador β) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas). O mecanismo exato pelo qual o nicorandil leva a inibição desses fatores não está claro, porém sabe-se que o NO inibe a expressão de TGF- β e que essa inibição pode ser via GMPc (SEGAWA *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 2003; SUDO *et al.*, 2009; KASTRATI *et al.*, 2010).

Substâncias com caráter regulatório sobre proliferação celular e o processo de apoptose, como o nicorandil, merecem atenção no esclarecimento de seus mecanismos, pois estas substâncias apresentam potencial uso na terapia de doenças como o câncer, doenças degenerativas (cardiovasculares e neurológicas), que estão intimamente ligadas ao desequilíbrio entre a proliferação e morte celular.

Para a avaliação dos efeitos e características da substância de interesse, vários testes podem ser utilizados, seja *in vitro* ou *in vivo*. Embora os sistemas *in vivo* reproduzam com mais semelhança as condições humanas, a cultura de células de mamíferos também permite verificar os mecanismos celulares, apresentando vantagens como facilidade de padronização das condições experimentais.

Testes de citotoxicidade são de grande importância e primordiais em um estudo, para se identificar substâncias e concentrações que possam levar a morte celular. Além de identificar a característica de citotoxicidade, estes testes auxiliam na escolha das concentrações da substância que serão testadas nos ensaios posteriores, evitando que ocorra escolha de concentrações inadequadas, que possam mascarar ou subestimar os dados obtidos em cada teste.

Com a finalidade de se encontrar as concentrações citotóxicas do nicorandil e do N-(beta-hidroxietil) nicotianmida o teste utilizado foi o ensaio de citotoxicidade MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), que avalia a atividade mitocondrial das células identificando morte celular ou inibição da atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983; HANSEN *et al.*, 1989). Este método baseia-se na capacidade da enzima succinato desidrogenase, presente na membrana mitocondrial, em reduzir o sal de tetrazolio (dimetiltiazol difenil tetrazolio, ou MTT) que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan ((1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difenilformazan)) que tem coloração roxa. Estes cristais podem ser solubilizados por dimetilsulfóxido (DMSO) produzindo uma solução que

pode ser analisada colorimetricamente em espectrofotômetro. A enzima succinato desidrogenase mantém sua atividade apenas em mitocôndrias íntegras, portanto, a reação ocorre apenas em células vivas, e o sinal gerado é dependente do nível de atividade celular.

Outro ensaio de viabilidade celular é baseado no método de exclusão do azul de tripan. Este ensaio se baseia na capacidade que as células vivas, com membrana íntegra, têm de repelir o azul de tripan. Desta forma, o corante só consegue penetrar em células que apresentam rupturas da membrana plasmática, deixando-as com a coloração azul. As células vivas apresentam-se arredondadas, transparentes, com a membrana refringente e os limites nítidos. A contagem de células é feita utilizando a câmara de *Neubauer* e microscópio de luz comum. Esse teste auxilia a avaliar se a população de células estudadas possui viabilidade satisfatória (>80%) em testes como, por exemplo, o de avaliação de genotoxicidade (Ensaio do Cometa) (GANTENBEIN *et al.*, 2008).

A influência na proliferação celular é uma característica importante a se avaliar em uma substância, já que a proliferação desequilibrada pode gerar disfunções. No caso da substância induzir excessiva proliferação ela pode gerar neoplasias e aterosclerose; e quando ela inibe a proliferação ela pode ser útil para o tratamento dessas mesmas desordens. Para verificar se a substância testada altera o ciclo celular, pode se utilizar o Ensaio de Cinética de Proliferação, e análise da curva de crescimento celular, que identifica se a divisão celular foi atrasada ou acelerada. Para isso, são realizadas contagens celulares em câmara de *Neubauer* após vários tempos de tratamento (24, 48, 72 e 96 horas) e uma curva de crescimento é montada de acordo com os valores obtidos.

Diversos ensaios são utilizados para a avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade de uma substância e estes podem ser aplicados em uma grande variedade de organismos-teste, desde microorganismos até plantas, animais experimentais e humanos, bem como em sistemas de cultura de células (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

Dentre os testes mais empregados e amplamente aceitos para investigação de substâncias que causam dano genético estão os ensaios Salmonella/microsossoma ou Teste de Ames (MORTELMANS *et al.*, 2000), o Teste do Micronúcleo (FENECH *et al.*, 1999; KRISHNA *et al.*, 2000) e o Ensaio do Cometa (BURLINSON *et al.*, 2007; WITTE *et al.*, 2007) utilizado no presente estudo.

O Ensaio do Cometa ou SCGE (*single cell gel electrophoresis*) é um método rápido e sensível para a detecção de danos primários no DNA que tem sido amplamente utilizado na Genética Toxicológica por ser um teste relativamente barato,

simples, flexível, de rápidos resultados, onde um pequeno número de células por amostra e pequenas quantidades da substância teste são suficientes para conduzir um experimento (TICE *et al.*, 2000). O princípio básico do ensaio está na migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. O padrão de cometa resulta da migração do DNA lesado em direção ao ânodo. Dentre as diferentes variações do SCGE, a versão alcalina (com desnaturação do DNA e eletroforese em $\text{pH} > 13$) é a que permite detectar o mais amplo espectro de dano ao DNA - quebras de fita simples e dupla, danos em sítios álcali-lábeis e ainda, sob certas condições *crosslinks* DNA-DNA, DNA-proteína, que (na ausência de outras lesões) aparecem como uma diminuição da migração do DNA quando comparado aos controles (HARTMANN *et al.*, 1997).

Outro aspecto interessante do nicorandil e do precursor que foi estudado neste trabalho é elas influenciam o processo de apoptose. A morte celular por apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento e atua como um mecanismo homeostático para manutenção dos tecidos (NICHOLSON *et al.*, 1997; ZIMMERMANN, *et al.*, 2001; ELMORE, 2007). Assim, o processo de apoptose remove do organismo as células indesejadas, danificadas ou infectadas por vírus, e quando esse processo é perturbado, podem ocorrer doenças, como câncer, aterosclerose, doenças auto-imunes e/ou neurológicas (BARIŠIĆ *et al.*, 2003; VERMEULEN *et al.*, 2005).

Kerr *et al.* (1972) foi o primeiro a propor o termo apoptose, que é definido pelas características morfológicas das células em morte, que incluem formação de bolhas na membrana citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, perda da adesão, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos e fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas ou macrófagos (BURZ *et al.*, 2009).

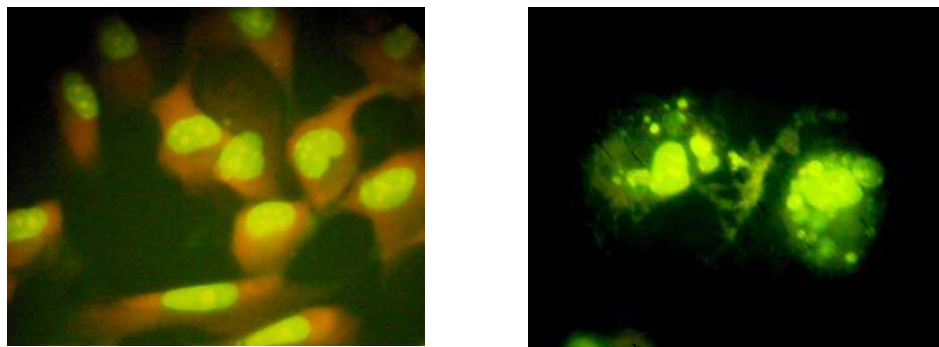


Figura 3 - Imagem da análise morfológica de apoptose. A esquerda padrão de célula normal, à direita padrão de célula apoptótica. Análise em microscópio de fluorescência em objetiva de 40x.

O processo apoptótico se divide em duas principais vias de acordo com o estímulo iniciador: a via extrínseca (ou por receptor de morte) e a via intrínseca (ou mitocondrial). A via extrínseca opera via sinais extracelulares que se ligam aos receptores de morte na superfície celular, e a via intrínseca que depende da ativação da mitocôndria, pela perda de sinais de fatores de crescimento ou em resposta a estímulo letal a partir do interior da célula, como danos no DNA e liberação de citocromo c da membrana mitocondrial (OKADA *et al.*, 2004; JIN *et al.*, 2005; ELMORE *et al.*, 2007; BURZ *et al.*, 2009).

As caspases são uma família de proteínas do tipo cisteína protease produzidas em quase todas as células animais e que desempenham papel central na maioria das vias de morte que levam à apoptose (LAUNAY *et al.*, 2005). Existem dois tipos de caspases, iniciadoras e efetoras. As iniciadoras, por exemplo, caspase8 e caspase9, estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica da via extrínseca e intrínseca respectivamente; e as caspases efetoras (por exemplo: caspase3, caspase7) que são responsáveis pela clivagem de substratos que promovem as características finais da célula apoptótica (GRIVICICH *et al.*, 2007).

A família BCL-2 é uma família de genes de proteínas envolvidas no processo apoptótico, que se divide em duas classes de genes, os pró apoptóticos (como o *BAX*), e os anti apoptóticos como o *BCL-XL* (CORY *et al.*, 2003; PETROS *et al.*, 2004). A proteína codificada pelo gene *BCL-XL* é uma proteína transmembrana mitocondrial que captura outros elementos pró apoptóticos inibindo assim a cascata apoptótica. (DEVERAUX *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2002).

Outras proteínas que inibem a apoptose são as integrantes do grupo das IAPs (proteínas inibidoras de apoptose) que tem a capacidade de inibir a atividade das caspases. Entre as IAPs já identificadas a survivina é uma delas e também é citada por estar envolvida na divisão celular (GRIVICICH *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2011).

Para avaliar a indução de apoptose pode se utilizar técnicas de avaliação morfológica, utilizando corantes, como o corante Laranja de Acridina que penetra na célula e cora seu DNA, permitindo observar as características morfológicas do núcleo, e diferenciar as células normais das apoptóticas pelas suas características de condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (ZIEGLER *et al.*, 2004; GRIVICICH *et al.*, 2007).

As características observadas em ensaios morfológicos são eventos tardios da cascata de apoptose. Para analisar eventos precoces da iniciação dos eventos apoptóticos é necessário avaliar os produtos da expressão de genes envolvidos no processo de iniciação e promoção da apoptose. Para esse fim podem ser utilizadas técnicas de PCR, em especial, a

PCR em tempo real que consegue detectar e quantificar quantidades muito pequenas de sequências específicas de ácidos nucléicos (VALASEK *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o nicorandil pode apresenta citotoxicidade, atividade antiproliferativa, genotoxicidade e influência na apoptose sobre células de carcinoma renal humano (786-O) e verificar se estes efeitos tem relação com a liberação de NO ou apenas com a estrutura química.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Para o nicorandil e seu precursor (N-(beta-hidroxietil) nicotinamida):
 - Determinar as concentrações citotóxicas pelo ensaio de citotoxicidade do MTT;
 - Dosar a liberação de óxido nítrico;
 - Avaliar interferência sobre o ciclo celular pelo ensaio de proliferação com contagem celular;
 - Verificar indução de danos no DNA pelo ensaio do cometa;
 - Avaliar por análise morfológica a indução de apoptose;
 - Analisar a expressão gênica de genes anti e pró-apoptóticos, pela técnica de qRT-PCR em tempo real.

- ✓ Comparar os resultados dos efeitos observados do nicorandil com os efeitos do seu precursor N-(beta-hidroxietil) nicotinamida, levando em consideração a dosagem de óxido nítrico em cultura.

3 ARTIGO

Artigo a ser submetido ao periódico *Toxicology in vitro*

Estudo do Efeito do Nicorandil e da Molécula Precursora em Cultura de Células (786-o), em Relação à Citotoxicidade, Crescimento e Morte Celular.

Study of the Effect of Nicorandil and of the Precursor Molecule in Cell Culture (786-o), in Relation to Cytotoxicity, Growth and Cell Death.

De Paula, NA¹; Niwa, AM¹; Vesenick, DC¹; Panis, C²; De Fátima, A³; Ribeiro, LR⁴; Mantovani, MS⁵

Resumo

O nicorandil, um doador de óxido nítrico (NO) e ativador de canal de potássio ATP sensível (K_{ATP}), é utilizado no alívio dos sintomas da angina, e tem como molécula precursora na sua síntese a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida, que não apresenta o radical NO₂ em sua estrutura, portanto não libera NO. O nicorandil pode influenciar a proliferação celular excessiva na disfunção renal, e a morte por apoptose no tecido cardíaco após a isquemia. Moléculas que apresentam caráter regulatório em processos celulares como crescimento e morte celular apresentam papel importante na pesquisa para a terapia de doenças que envolvam alteração desses processos. Assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar em cultura de células de carcinoma renal humano (786-O) a citotoxicidade, influência no crescimento celular, indução de apoptose e potencial genotóxico do nicorandil, e para verificar a atuação da molécula independente da liberação de NO foi avaliada a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT, e as moléculas apresentaram citotoxicidade a partir de 24h em concentrações diferentes, o nicorandil em 2000 µg/mL e a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida em 3000 µg/mL, sendo que essa diferença pode ser pela presença de NO. Nos demais ensaios nicorandil e a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida foram testados nas concentrações de 20, 100 e 500 µg/mL e não apresentaram resultados diferentes entre si. As duas moléculas não foram genotóxicas no ensaio do cometa e não alteraram o crescimento celular das células renais. Na avaliação morfológica da apoptose não houve alteração no número de células apoptóticas, e a expressão dos genes da via apoptótica testados também não

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

² Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

⁵ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina, Paraná, Brasil - Universidade Estadual de Londrina - Campus Universitário - P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brazil. - CEP: 86051-990 - e-mail: biomsm@uel.br - Phone: 55 43 3371-4977

foi alterada. Concluímos que o nicorandil é citotóxico apenas em altas concentrações, e não altera os outros processos avaliados nas células renais e a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida concorda em todos os resultados com o nicorandil, exceto pela sua citotoxicidade ser menor, provavelmente pela ausência de NO.

Palavras chave: Nicorandil. N-(beta-hidroxietil) nicotinamida. Proliferação celular. Apoptose. Células 786-O.

1 Introdução

O nicorandil (éster nitrato de N-(beta-hidroxietil) nicotinamida) pertence ao grupo dos nitratos orgânicos (RONO₂) como a nitroglicerina (TNG) e é usado no tratamento de disfunção cardíaca e dos sintomas da angina pectoris. Ele possui duas características, é doador de óxido nítrico (NO) e ativador de canal de potássio ATP-sensível (K_{ATP}) (SIMPSON *et al.*, 2004; BARRETO *et al.*, 2005; HIREMATH *et al.*, 2010). Possui habilidade de hiperpolarizar a membrana das células musculares e ser um potente vasodilatador (FRYDMAN, 1992), permitindo vasodilatação coronariana e periférica, diminuindo a pressão de entrada e saída (*preload* e *afterload*) do fluxo sanguíneo no coração, e é capaz também de produzir um pré-condicionamento isquêmico, gerando proteção para o tecido cardíaco (EECKHOUT, 2003; CARREIRA *et al.*, 2008).

Os nitratos orgânicos doam o NO por dois mecanismos, via enzimática envolvendo as enzimas glutationa S-transferase (GST), xantina oxidase (XO) ou enzimas do complexo citocromo P450 (SETH *et al.*, 1993); ou por via não-enzimática reagindo quimicamente com ácidos, álcalis, metal e tióis (CHONG *et al.*, 1991; HARRISON *et al.*, 1993). O NO liberado atua como uma molécula sinalizadora que se difunde facilmente pela membrana plasmática, e se liga à enzima guanilato ciclase solúvel (GC) catalisando a conversão de guanosina-5'-trifosfato (GTP) intracelular em guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc por sua vez atua como segundo mensageiro na manutenção do tônus e na motilidade da musculatura lisa dos vasos, promovendo vasodilatação; além de atuar em diversas outras vias como no crescimento e diferenciação celular, manutenção da homeostase de fluidos e eletrólitos, e na apoptose (KRUMENACKER *et al.*, 2006; MUJOO *et al.*, 2010).

O outro mecanismo envolvido na ação farmacológica do nicorandil é a abertura do canal K_{ATP}, que interfere no potencial de membrana celular, alterando o fluxo de Ca⁺ intracelular envolvido no mecanismo de contração muscular (SATO *et al.*, 2000).

Além do efeito sobre a vasodilatação, estudos tem mostrado que o nicorandil atua inibindo a morte celular do tecido cardíaco e a excessiva proliferação no tecido renal.

Os eventos recorrentes de isquemia-reperfusão geram alteração no funcionamento mitocondrial, o que desencadeia a apoptose nessas células, estudos anteriores mostram que o nicorandil ativa canais K_{ATP} , inibindo a despolarização da membrana mitocondrial e a consequente liberação de citocromo c para o citosol inibindo a apoptose (SATO *et al.*, 2000; AKAO *et al.*, 2002; NAGATA *et al.*, 2003; LU *et al.*, 2006; CARREIRA *et al.*, 2008).

Akao e colaboradores (2002) observaram a inibição de liberação de citocromo c em cardiomiócitos de rato tratados com nicorandil e expostos a condições de estresse oxidativo. Em condições de isquemia-reperfusão, testada por Lu e colaboradores (2006) os animais que receberam nicorandil tiveram uma proteção contra os danos pós-isquemia. E Nishikawa e colaboradores (2006) concluíram que o nicorandil inibiu apoptose em miócitos por via de sinalização $GMPC$, e também por ativação de canal K_{ATP} , inibindo liberação de citocromo c, além de influenciar na atividade e expressão de proteínas envolvidas no processo de apoptose, como caspase3, *BAX* e *BCL-2*.

Além de proteger o tecido cardíaco da morte celular o nicorandil pode diminuir a excessiva proliferação das células mesangiais dos glomérulos que ocorre em algumas desordens e pode agravar a situação cardíaca (SEGAWA *et al.*, 2001; SUDO *et al.*, 2009). O nicorandil pode atuar inibindo a proliferação celular pela diminuição da expressão de $TGF-\beta$ (fator crescimento transformador β) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas). O mecanismo exato pelo qual o nicorandil atua ainda precisa ser esclarecido, porém sabe-se que o NO inibe a expressão de $TGF-\beta$ e que essa inibição pode ser via $GMPC$ (SEGAWA *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 2003; SUDO *et al.*, 2009; KASTRATI *et al.*, 2010).

Estudos de substâncias com caráter regulatório sobre proliferação celular e o processo de apoptose, como o nicorandil, são importantes, pois elas apresentam potencial uso na terapia do câncer. Assim o presente estudo avaliou o nicorandil em cultura de carcinoma renal humano, para verificar o potencial citotóxico e os possíveis efeitos sobre a apoptose e o ciclo celular. E para verificar se os efeitos do nicorandil são relacionados com a liberação de NO ou com a estrutura independente desse radical foi testada a sua molécula precursora (N-(beta-hidroxietil) nicotinamida) que não possui o radical NO_2 .

2 Materiais e Métodos

2.1 Agentes Químicos

O nicorandil, éster nitrato de N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida (2-NN); e a molécula precursora do nicorandil, N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida (L1) (não possui o radical nitrito NO₂-), são derivadas do ácido nicotínico e foram sintetizadas no laboratório de química, da Universidade Federal de Minas Gerais, e fornecidas pelo professor Dr. Ângelo de Fátima. Elas foram dissolvidas na concentração 200 mg/mL, em dimetilsulfóxido (DMSO-Mallinckrodt) e diluídas nas concentrações de uso em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco).

E como controle de indução de danos foi utilizada a Doxorubicina (Adriplastina®-Pharmacia) para os testes de citotoxicidade (0,5 µg/mL), proliferação celular (0,1 µg/mL) e genotoxicidade (0,1 µg/mL); e para o ensaio de indução de apoptose foi utilizado a Camptotecina (Acros Organics) (20 µg/mL). O DMSO foi utilizado nos controles na mesma proporção presente na maior concentração dos tratamentos de cada ensaio.

2.2 Linhagem Celular

A linhagem celular utilizada neste estudo foi a 786-O, Células de Carcinoma Renal Humano, linhagem gentilmente fornecida pelo Prof. João Ernesto de Carvalho - CPQBA / UNICAMP.

As células 786-O são cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco), em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

2.3 Ensaio de citotoxicidade

Para testar a citotoxicidade do nicorandil e da N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida, além de escolher as concentrações para os demais ensaios, utilizou-se o ensaio de citotoxicidade com MTT- (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

(Invitrogen), realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações.

Foi utilizada placa de cultura de 24 poços, em cada poço com 500 µL de meio DMEM com 10% SBF, foram semeadas 5×10^3 células, exceto nos 3 poços referentes ao controle da placa que receberam apenas meio sem células. A placa foi mantida na estufa de CO² à 37° por 24 horas para estabilização das células. Após este período o meio foi descartado e 500 µL de meio novo com o tratamento foi adicionado e a placa foi mantida em estufa por 24h, 48h e 72h.

Para se encontrar a concentração citotóxica do nicorandil e do precursor foram testadas as concentrações: 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 µg/mL. Para o controle positivo foi utilizada a doxorubicina 0,5 µg/mL e controle com meio de cultura com 1,5% DMSO.

Decorrido o tempo de tratamento o meio foi retirado, e colocou-se meio sem soro com o sal de MTT na concentração de 0,167mg/mL. A placa foi incubada por mais 4h e então o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan diluídos em 500 µL de DMSO.

Cada tratamento foi testado em 3 poços por placa (replicata), e o experimento foi feito com 3 repetições. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 550nm. E para melhor visualização dos dados, as absorbâncias foram transformadas em porcentagem de sobrevivência celular pela fórmula (HUANG, *et at.* 2005):

$$\% \text{ viabilidade} = (A_{\text{teste}} - A_{\text{branco}}) / (A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}}) \times 100\%$$

Onde, *A* = Absorbância média

2.4 Dosagem de Óxido Nítrico na cultura

O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor e sua mensuração é possível através da detecção dos produtos de sua decomposição, o nitrato e o nitrito. Neste trabalho a dosagem foi feita no Laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres da Universidade Estadual de Londrina, pelo método de Griess (GRIESS, 1879) com modificações (PANIS, 2010).

Foram utilizadas 2 placas de cultura de 24 poços, na primeira placa 18 poços receberam 300 µL de meio com SBF e 10^4 células, na segunda placa 18 poços

receberam apenas meio com SBF. As placas foram mantidas em estufa por 24h para estabilização das células. Após este período foi acrescentado, em cada poço, 300 μ L de meio com tratamento: controle 0,25% DMSO, doxorrubicina 0,1 μ g/mL, nicorandil 20, 100 e 500 μ g/mL e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 20, 100, 500 μ g/mL; estes mesmos tratamentos foram adicionados nos poços com ausência de células para se observar a liberação do NO independente da presença das células, além destes foi feito um controle com meio e células e outro com apenas meio. Cada tratamento foi feito em 2 poços (duplicata).

Após os tempos de incubação de 1, 12, 24 e 48h, foram coletados 60 μ L do sobrenadante de cada poço.

As amostras passaram primeiro por desproteinização, com a adição de 50 μ L de ZnSO₄ 75 mM, homogeneizadas no vórtex, centrifugadas por 2 minutos a 1000rpm à 4°C, em seguida foi adicionado 70 μ L de NaOH 55 mmol/L, homogeneizadas em vórtex novamente e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm à 4°C, 250 μ L do sobrenadante foi transferido para outro tubo e diluído em 50 μ L de tampão glicina-NaOH 45g/L pH 9,7.

Grânulos de cádmio (mantidos em H₂SO₄ 100 mM) foram lavados 3 vezes em água destilada e depois para ativação, deixados por 5 minutos em CuSO₄ 5 mM (CuSO₄ em tampão glicina-NaOH 15 g/L pH 9,7). Em seguida os grânulos ativados foram adicionados à amostra e deixados na mistura sob leve agitação por 10 minutos para que o nitrato da amostra fosse convertido em nitrito.

Após conversão de nitrato em nitrito, as amostras foram transferidas para outro tubo, e o mesmo volume de reagente de Griess (reagente I: 50 mg de N-naftil etilenodiamina em 250 mL de água destilada; reagente II: 5 g de sulfanilamida em 500 mL Ácido Fosfórico 5%) foi adicionado para determinação de nitrito. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos e após este tempo centrifugados a 10000rpm por 2 minutos. Para a leitura das absorbâncias, em uma placa de 96 poços, 100 μ L de cada tubo foi transferido em triplicata.

Para determinar a concentração de nitrito nas amostras uma curva de calibração foi preparada com solução estoque 250 μ M de NaNO₂ e diluídas seriadamente com água destilada até 7,8 μ M. A absorbância foi lida a 550nm. Os resultados finais foram apresentados em μ M de nitrito.

2.5 Cinética de Proliferação

Para verificar se o nicorandil e a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida influenciam o ciclo celular das células 786-O, foram feitas curvas de proliferação após contagem das células nos tempos de tratamentos 24h, 48h, 72h e 96h.

Utilizou-se tubo de cultura (10cm²), onde foram semeadas 2,6x10⁴ células por tubo, contendo 2,6 mL de meio de cultura com SBF e com os respectivos tratamentos: controle negativo (0,25% DMSO); controle positivo Doxorrubicina (0,1 µg/mL); nicorandil e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida nas concentrações de 20 µg/mL, 100 µg/mL e 500 µg/mL (concentrações definidas pelos resultados do teste do MTT).

Foi semeado um tubo com cada tratamento (8 tratamentos diferentes) para cada um dos tempos de cultivo (4 tempos diferentes). O experimento foi feito com 3 repetições.

Após cada tempo de incubação, um tubo de cada tratamento foi tripsinizado e as células contadas em câmara de *Neubauer*. Com essa mesma suspensão celular foi feita a viabilidade celular com azul de tripan.

A curva com a cinética de proliferação celular foi feita com 5 pontos referentes aos tempos de tratamento (0h, 24h, 48h, 72h e 96h).

2.6 Ensaio do Cometa (SCGE)

Em frascos de cultura de 25cm² foram adicionados 5 mL de meio de cultura com 10% SBF e foram semeadas 5x10⁵ células. Os tratamentos: controle (0,25% DMSO); controle indutor de danos no DNA (doxorrubicina 0,1 µg/mL); nicorandil (20, 100 e 500 µg/mL) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (20, 100 e 500 µg/mL) foram adicionados após 24h de estabilização.

O ensaio do cometa-SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis*) foi realizado em condições alcalinas como descrito por Singh *et al.* (1988) e de acordo com Tice (2000).

Após três horas de tratamento as células foram tripsinizadas, 20 µL de suspensão celular foi cuidadosamente homogeneizada com 120 µL de agarose LMP (baixo ponto de fusão, 0,5%, Gibco), distribuídas em lâminas pré-tratadas com agarose comum (Invitrogen) e cobertas com lamínula. Após 20 minutos na geladeira, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mantidas em solução de lise (1 mL Triton e 10 mL DMSO em 89 mL

lise estoque [14,61g NaCl, 3,22g EDTA, 0,12g Tris, 89 mL H₂O deionizada] e NaOH para acertar pH 10) por 60 min à 4°C. Terminado o tempo de lise as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese com tampão alcalino pH 13 (5 mL EDTA, 30 mL NaOH, H₂O deionizada q.s.p. 1000 mL) em repouso para desnaturação por 20 minutos antes do início da corrida. A eletroforese foi realizada em pH 13, 25V, 300mA por 20min. Após a corrida eletroforética as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (48,5g Tris-0,4M e H₂O deionizada q.s.p. 1000 mL e HCl para acertar pH), fixadas com álcool etílico e o momento da análise, coradas com brometo de etídio (20 µg/mL).

Foram analisadas 100 células por tratamento, em microscópio de fluorescência em objetiva de 40x. Classificando-as em células com danos de classe 0 a 3, conforme o comprimento e intensidade da cauda. Critério de classificação: (a) *classe 0*, ausência de cauda, ausência de danos visíveis; (b) *classe 1*, cauda com até o diâmetro da cabeça do cometa, dano pequeno; (c) *classe 2*, cauda de tamanho médio, com 2 vezes o diâmetro da cabeça, dano médio; (d) *classe 3*, cauda longa, com comprimento superior a 2 vezes o diâmetro da cabeça, grandes danos (KOBAYASHI, *et al.*,1995).

Para análise dos dados foi calculado o escore pela somatória de células com cometa multiplicado por suas respectivas classes [Escore = $\sum(\text{número de células} \times \text{classe})$].

A viabilidade celular foi verificada por exclusão do azul de tripan, sendo que a viabilidade satisfatória para o teste do cometa foi considerada acima de 80%. O experimento foi feito com três repetições

2.7 Indução de Apoptose

Em placa de cultivo de seis poços foi colocada uma lamínula em cada poço e posterior a isso 3 mL de meio com SBF e $4,3 \times 10^4$ células por poço. A placa foi mantida na estufa por 24h para estabilização.

Após o tempo de estabilização os tratamentos foram acrescentados aos poços: nicorandil (20, 100 e 500 µg/mL), N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (20, 100 e 500 µg/mL), o controle de indução de apoptose (camptotecina 20 µg/mL) e o controle (meio com 0,25% de DMSO).

Após 24h de incubação com o tratamento, a lamínula foi coletada como descrito por Rovozzo (1973) e de acordo com modificações de Tsuboy *et al.* (2010). Lavada em solução salina (PBS), fixada em fixador Carnoy (Metanol:Ácido acético, 3:1), submersa

em uma bateria de álcoois (95%, 75%, 50% e 25%), transferida para tampão McIlvaine (Ácido cítrico 0,1M [1,92g ac cítrico+100 mL metanol 25%] e Fosfato dissódico 0,2M [2,84g fosfato de sódio dibásico+100 mL metanol 25%]) por 5 minutos, Acridina 0,01% (diluída em tampão McIlvaine) por 5 minutos e transferida novamente para tampão McIlvaine por mais 5 minutos. A lamínula foi vertida sobre uma lâmina contendo uma gota de tampão McIlvaine e selada na lâmina com esmalte.

As características morfológicas consideradas foram: núcleo com cromatina condensada e presença de corpos apoptóticos para células em apoptose; e núcleo intacto e uniforme para as células normais. Para cada tratamento foram analisadas 500 células em microscópio de fluorescência em objetiva de 40x.

2.8 RT-PCR em Tempo Real

O experimento de RT-PCR em tempo real foi realizado seguindo orientações do MIQE Guidelines: *The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (BUSTIN *et al.*, 2009).

Em frascos de 25cm² foram semeadas 5x10⁵ células em 5 mL de meio DMEM com 10% SBF. Após 24h de estabilização em estufa foi acrescentado o tratamento em duplicata: Controle (0,25%DMSO), nicorandil 500 µg/mL e N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida 500 µg/mL. Após 12h de tratamento as células foram tripsinizadas e o RNA total foi extraído usando reagente Trizol-LS (Invitrogen) de acordo com o fabricante. Após a extração, o RNA foi ressuscitado em 30 µl água DEPC e tratado com 0,3 µl DNase I Amplification Grade (Invitrogen), e mantidas em gelo. Para quantificar o RNA total extraído, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro, e prosseguiram no experimento as amostras com razão entre 1,9 e 2,1 (razão dos valores das absorvâncias de 260 e 280 [A₂₆₀/A₂₈₀]). A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 0,8%.

O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µL de RNA total (1µg), utilizando-se 2 µL de dNTPs [2,5 µM] (Invitrogen), 1 µL de Oligo-dT [10 pM] (Invitrogen) e 9,9 µL de água DEPC, esse mix foi incubado a 65°C por 5 minutos no termociclador (TECHNE® TC 412) e transferido rapidamente para o gelo. Em seguida, a ele foi adicionado 4 µL de tampão da Mlv 5x (Invitrogen®), 0,1 µL inibidor de ribonuclease (RNase out –Invitrogen®) e 1 µL de transcriptase reversa (M-Mlv-RT – Invitrogen ®). E para se completar a reação as amostras

foram incubadas no termociclador a 37°C por 50 minutos, e a 70°C por 15 minutos. O cDNA foi mantido em *freezer* -80°C.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador PTC 200 DNA Engine Cyclor, usando o sistema de detecção Chomo 4 (MJ Research- BIO RAD), e SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG - Invitrogen). Após a desnaturação inicial (50°C por 2 minutos e 95°C por 3 minutos), foram feitos 39 ciclos com três etapas: desnaturação (95°C por 20 segundos); anelamento do *primer* (60°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 20 segundos), e ao final dos ciclos a curva de *melting* (50°C até 95°C). O gene de referência usado foi o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

O experimento foi feito com duas repetições, e cada amostra processada em três repetições mecânicas. A sequência de oligonucleotídeos dos primers usados pode ser observada na tabela 01.

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados na reação de PCR em Tempo Real.

Gene	Primers	Referências ou nº de acesso (NCBI)
<i>GAPDH</i>	F:5'ACAAGATTGTGAAGG TCG GTG TCA 3' R:5'AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT 3'	SUGAYA <i>et al.</i> , 2005 (com modificações)
<i>CASP8</i>	F:5' GCAAAAGCACGGGAGAAAAGT 3' R:5' TGCATCCAAGTGTGTTCCATT3'	CASTANEDA & ROSIN-STEINER, 2006
<i>CASP9</i>	F:5' GCTCTTCCTTTGTTTCATCTCC 3' R:5' GTTTTCTAGGGTTGGCTTCG 3'	CHEN <i>et al.</i> , 2009
<i>BIRC5</i>	F:5' AGCCCTTCTCAAGGACCAC 3' R:5' TGGCTCGTTCTCAGTGGGGCAGT 3'	ZHANG <i>et al.</i> , 2001
<i>BCL-XL</i>	F:5' TGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAAT 3' R:5' ATGTAG TGGTTCTCCTGGTGCAA 3'	NCBI ID: NM_138578.1 (construído)

2.9 Análise Estatística

Os dados obtidos no estudo foram analisados através do programa estatístico GraphPad InStat, considerando $p < 0,05$, sendo que para os ensaios de Citotoxicidade, Cinética de Proliferação, Indução de Apoptose e Genotoxicidade foi utilizado o teste ANOVA seguido de Dunnett onde os tratamentos foram comparados com o controle; e os dados de dosagem de NO foram analisados pelo ANOVA seguido de Tukey.

Os níveis de expressão dos genes estudados foram determinados pelo método de Pfaffl (2001), com análise estatística realizada através do Software REST-384 (PFAFFL *et al.*, 2002).

3 Resultados

3.1. Ensaio de Citotoxicidade

Como demonstrado pelas absorbâncias obtidas no ensaio do MTT, o nicorandil apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$, e a N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida na maior concentração testada, 3000 $\mu\text{g/mL}$, nos três tempos de tratamento (24h, 48h e 72h). A redução da viabilidade celular média dessas concentrações foi de 40%, sendo que as concentrações menores apresentaram viabilidade celular semelhante ao do controle (Figura01).

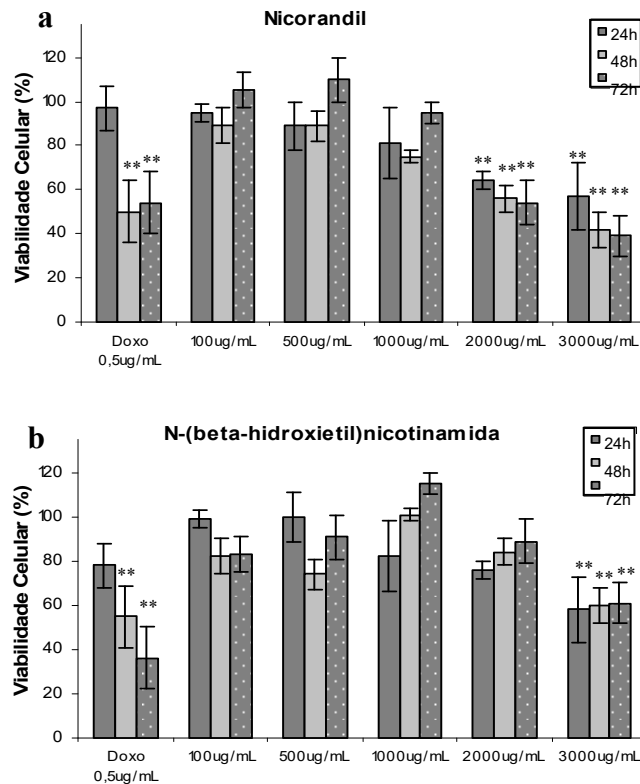


Figura 1 - Viabilidade Celular Média (%) obtida no teste de citotoxicidade MTT. Células 786-O tratadas com (a) nicorandil e (b) N-(beta-hidroxi-etil) nicotinamida por 24, 48 e 72h. ** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$. Considerando Controle (DMSO) viabilidade 100% .

3.2 Dosagem de Óxido Nítrico

Os valores obtidos na dosagem de NO demonstram que, em relação ao controle, apenas os tratamentos com nicorandil apresentaram aumento na concentração de NO no meio de cultura. A concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (325,8 μM) foi a que apresentou maior diferença em relação ao controle (42,4 μM) (oito vezes mais), apresentando diferença estatisticamente significativa em todos os pontos de dosagem.

Através dos dados obtidos pode se observar que os tratamentos com a N-(beta hidroxietil) nicotinamida não apresentaram liberação de NO diferente do controle, como era esperado uma vez que o precursor não apresenta o grupo NO_2 em sua estrutura. A Figura 02 mostra as quantidades médias de NO em cada tratamento e nos quatro tempos dosados.

Foi verificada liberação de NO em vários protocolos de tratamento com e sem células, e observou-se diferença estatística de concentração de NO no tratamento 500 $\mu\text{g/mL}$ de nicorandil na dosagem em 1h, onde o tratamento em presença de células apresentou menor concentração de NO (285,3 μM) em relação ao mesmo tratamento na ausência de células (383,0 μM) (Figura 03), nos outros pontos de dosagem essa diferença não foi mais observada.

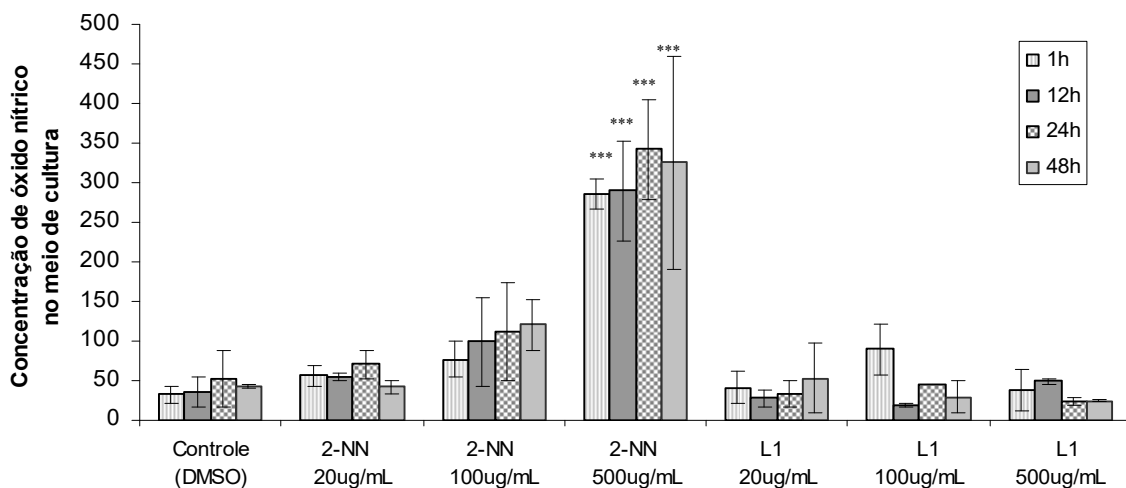


Figura 2 - Concentração média de Óxido nítrico (NO) no meio de cultura com células 786-O, tratadas com nicorandil (2-NN) ou com N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1). Dosagem feita após quatro tempos de exposição (1, 12, 24 e 48h). Controle 0,25% DMSO. *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($P < 0.001$).

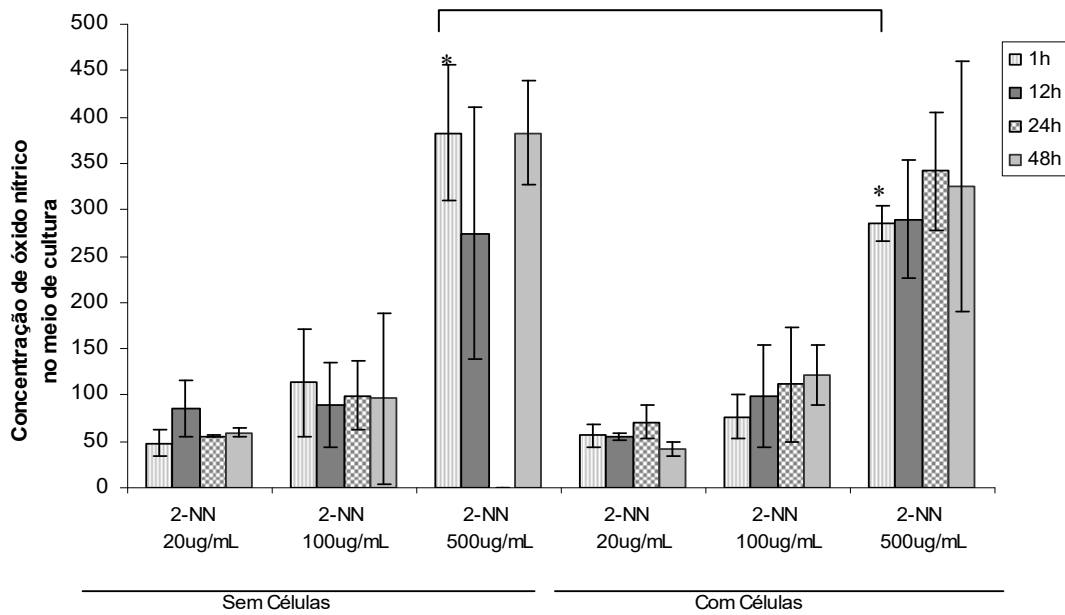


Figura 3 - Concentração média de óxido nítrico (NO) liberado no meio de cultura na ausência e presença das células 786-O, tratadas com nicorandil. Dosagem feita após quatro tempos de exposição (1, 12, 24 e 48h). * Diferença estatisticamente ($P < 0.05$) ausência vs. presença de célula.

3 Cinética de Proliferação Celular

Através dos dados obtidos, não houve diferença estatística no crescimento celular das células 786-O tratadas com nicorandil e com N-(beta-hidroxietil) nicotinamida, em nenhuma das concentrações testadas, em relação ao controle. Os valores de viabilidade obtidos pelo azul de tripan, superiores a 90%, mostram que não houve diminuição da viabilidade celular em nenhum dos tratamentos. A curva de cinética de proliferação pode ser vista na Figura 04.

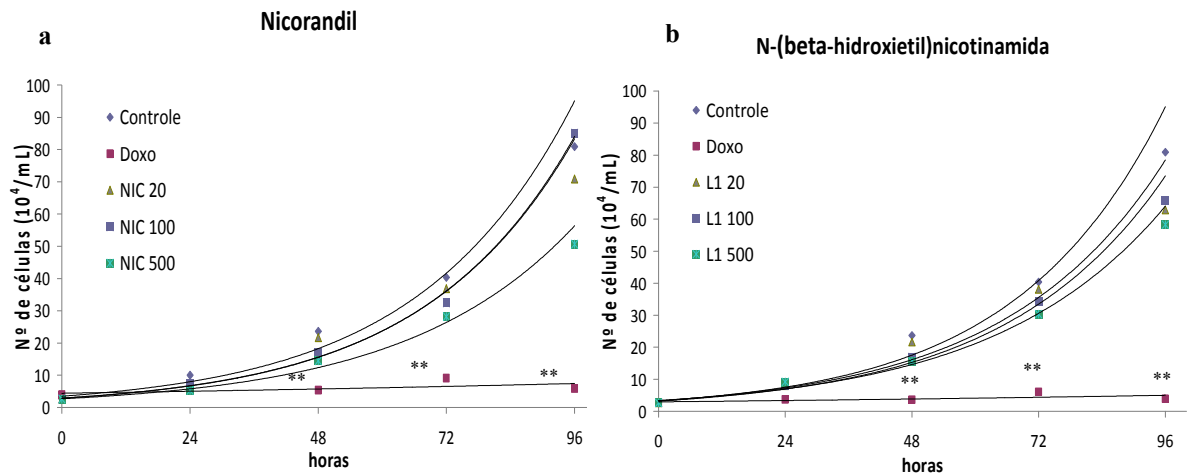


Figura 4 - Curva de cinética de proliferação das células 786-O tratadas com (a) nicorandil (2-NN) e (b) N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1). Obtida com os valores da contagem celular na câmara de *Neubauer*, após os tempos de tratamento 24, 48, 72 e 96h. (Controle 0,25%DMSO). ** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$.

3.4 Ensaio do Cometa (SCGE)

A análise estatística do escore de cada tratamento, tanto do nicorandil quanto da N-(beta-hidroxietil) nicotinamida, mostrou que nenhuma das concentrações testadas aumentou significativamente a migração de fragmentos de DNA no período de 3 horas de tratamento, em relação ao controle (Tabela 02).

Os valores obtidos pela exclusão do azul de tripan (acima de 93%) mostraram que não houve alteração na viabilidade celular (considerada ótima acima de 80% para o teste do cometa).

Tabela 2 - Número médio de células com dano, distribuição nas classes de cometa e escore médio dos cometas, referente às células tratadas com nicorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1), por 3h. (Média ± Desvio Padrão).

Tratamentos	Genotoxicidade						Escore
	Número médio de Células com danos	Classes					
		0	1	2	3		
Controle	14 ± 3	86 ± 3	13 ± 2	1 ± 2	0 ± 0	15 ± 5	
Doxo 0,1 µg/mL	63 ± 12	37 ± 12	54 ± 11	7 ± 6	2 ± 3	74 ± 18**	
2-NN 20 µg/mL	32 ± 3	60 ± 16	29 ± 1	2 ± 2	1 ± 1	34 ± 5	
2-NN 100 µg/mL	29 ± 13	71 ± 13	25 ± 10	4 ± 4	1 ± 1	33 ± 16	
2-NN 500 µg/mL	17 ± 7	83 ± 7	16 ± 6	1 ± 1	0 ± 0	18 ± 8	
L1 20 µg/mL	37 ± 10	63 ± 10	34 ± 7	3 ± 1	1 ± 1	42 ± 13	
L1 100 µg/mL	33 ± 6	67 ± 6	27 ± 8	6 ± 3	1 ± 1	41 ± 5	
L1 500 µg/mL	29 ± 11	71 ± 11	23 ± 8	6 ± 4	1 ± 1	36 ± 14	

** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$

3.5 Análise Morfológica de Indução de Apoptose

Na análise morfológica, a condensação da cromatina e corpos apoptóticos foi observada apenas no tratamento com camptotecina. Nos demais tratamentos, nicorandil e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida, não foi encontrado diferença no número de células apoptóticas em relação ao controle, durante as 24h de tratamento (Figura05).

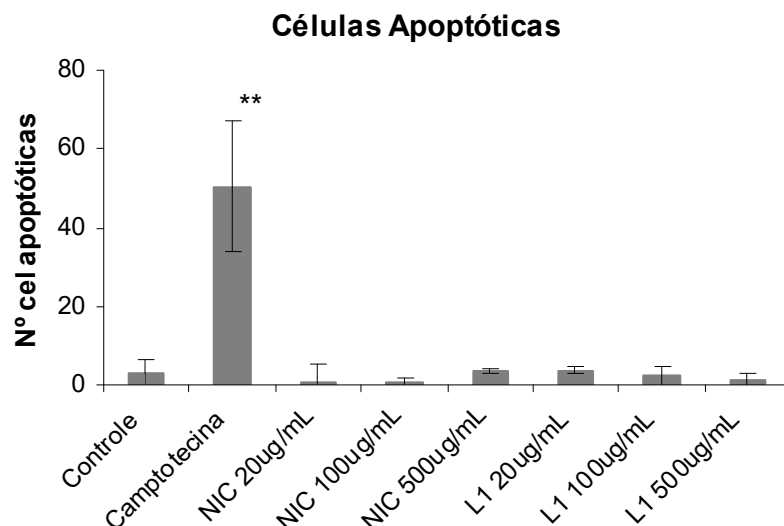


Figura 5 - Número médio de células apoptóticas na cultura de célula 786-O tratada com nicorandil e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1) por 24h (500 células analisadas por tratamento). Controle 0,25% DMSO, Camptotecina 20 µg/mL. ** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$

3.6 Expressão Gênica

A fim de verificar a ocorrência de possíveis eventos precoces do processo apoptótico, não visíveis morfologicamente, foi feita a análise da expressão gênica dos genes pró-apoptóticos *CASP8*, que transcreve para proteína caspase8 iniciadora da via extrínseca; e *CASP9*, que transcreve para proteína caspase9 iniciadora da via intrínseca; além de dois genes anti-apoptóticos, *BIRC5*, que transcreve para proteína survivina que é uma inibidora de caspase, e o gene *BCL-XL* (família *BCL-2*) que transcreve para uma proteína transmembrana mitocondrial.

Nenhum dos quatro genes apresentou alteração significativa no nível de expressão nos tratamentos em relação ao controle (Figura 06). Porém os tratamentos nicorandil e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida, apresentaram um padrão na expressão dos quatro genes testados, sendo que as células tratadas com nicorandil apresentaram um aumento na taxa de transcritos dos quatro genes avaliados, enquanto no tratamento com o precursor houve uma diminuição na taxa de expressão. O gene *BCL-XL* foi o que apresentou a maior diferença no nível de expressão entre os dois tratamentos, porém a diferença não foi significativa. Os valores podem ser observados na Figura 07.

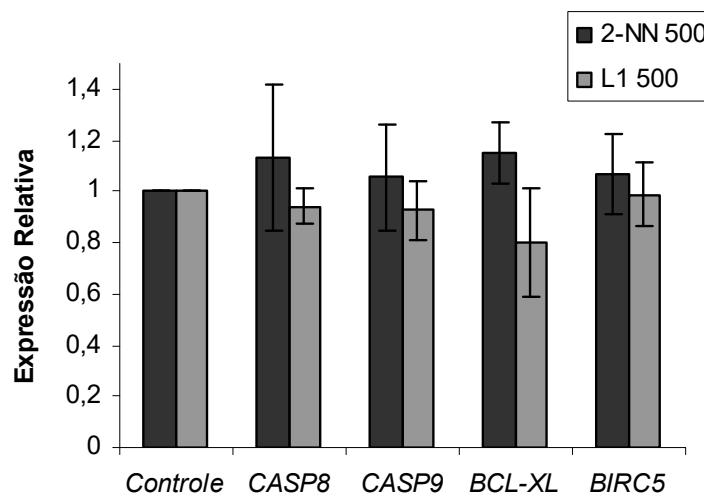


Figura 6 - Expressão relativa dos genes *CASP8*, *CASP9*, *BCL-XL* e *BIRC5*, avaliada por RT-PCR em tempo real, das células 786-O após 12 horas de tratamento com nicorandil 500 µg/mL (2-NN 500), N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL (L1 500) e Controle (0,25%DMSO). Os dados foram normalizados com o gene *GAPDH*.

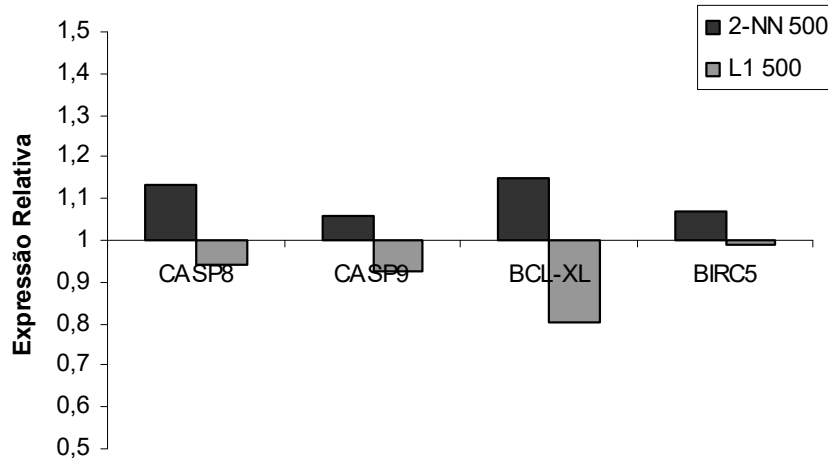


Figura 7 - Expressão relativa dos genes *CASP8*, *CASP9*, *BCL-XL* e *BIRC5* por RT-PCR em tempo real, comparando a expressão entre os dois tratamentos. Células 786-O tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL (2-NN 500) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL (L1 500). Expressão relativa do controle = 1. Os dados foram normalizados com o gene *GAPDH*.

4 Discussão

O NO em baixas concentrações, atua como molécula sinalizadora na fisiologia normal, e é responsável pelo bom funcionamento de vários sistemas do organismo. O aumento na síntese de NO está relacionado com condições fisiopatológicas, como nas doenças degenerativas neurais (Parkinson, Alzheimer), ou em situações de infecção e inflamação (DIMMELER *et al.*, 1997).

A diferença estrutural entre as duas moléculas estudadas é a presença do radical NO₂, com liberação de NO em cultura pelo nicorandil e ausência desse evento no tratamento com a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida. O experimento de dosagem de NO em cultura confirmou essa afirmação, apenas as culturas que receberam nicorandil apresentaram concentração de NO diferente do controle, e a maior concentração de NO no meio de cultura foi observado na maior concentração de nicorandil (500 µg/mL) testada (8x maior que o controle). Assim os possíveis resultados diferentes entre as duas moléculas deve-se a presença de NO.

A sensibilidade ao NO varia de célula para célula, e de acordo com as condições do microambiente. O elétron não pareado do radical reage facilmente com oxigênio, radical superóxido, ou metais de transição, como ferro, cobalto, manganês ou cobre. A relativa importância de enzimas que apresentam estes grupos, como o ferro-enxofre (grupo

heme) nas diferentes células, pode influenciar a sensibilidade de cada tipo celular às concentrações de NO (MONCADA *et al.*, 1991; WINK *et al.*, 1998).

Em um estudo onde duas linhagens diferentes de células neurais (astrócitos e micróglia) foram expostas ao NO (35 μM), observou-se que enquanto os astrócitos não apresentaram diminuição na viabilidade celular, as células micróglias tiveram uma redução de 90% na viabilidade (HWANG *et al.*, 2009). Em nosso estudo quando as células renais foram expostas a uma quantidade similar de NO, (liberada nos tratamentos com nicorandil 20 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$), não houve nenhuma alteração na viabilidade.

A concentração citotóxica do nicorandil sobre as células 786-O foi de 2000 $\mu\text{g/mL}$, reduzindo a viabilidade celular para 64%. A concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ mostrou uma leve redução na viabilidade (81% em 24h), porém não foi estatisticamente significativa. A citotoxicidade do precursor (N-(beta-hidroxietil) nicotinamida) foi encontrada na concentração mais elevada (3000 $\mu\text{g/mL}$), a qual reduziu para 58% a viabilidade celular. Esse resultado pode ser devido à ausência do radical NO nos tratamentos com o precursor, indicando que a presença do NO nos tratamentos com o nicorandil o faz mais citotóxico que a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida para as células 786-O.

Não há na literatura dados quanto à genotoxicidade do nicorandil. Porém, a genotoxicidade relatada do NO é dependente de concentração e condições do microambiente, e é atribuída principalmente a sua reação indireta, onde sua interação com outras moléculas (ex. radical anion superóxido) pode gerar radicais e moléculas (RNOS, como peróxido nitrito; e nitrosaminas cancerígenas) capazes de modificar proteínas e até mesmo atuar diretamente nos nucleotídeos da molécula de DNA; além de inibir os mecanismos necessários para reparo de lesões do DNA (NGUYEN *et al.*, 1992; MASRI, 2010).

O ensaio de genotoxicidade do Cometa, que avalia danos primários e passíveis de reparo, foi realizado para verificar se há indução de quebras no DNA após as três primeiras horas de exposição ao nicorandil e à N-(beta-hidroxietil) nicotinamida. Os resultados mostram que após o período de exposição os danos no DNA das células 786-O não foram estatisticamente significativos.

Sudo *et al.* (2009) mostraram que em ratos portadores de glomerulonefrite que apresentam exagerada proliferação das células dos glomérulos, quando tratados com nicorandil (30mg/Kg), apresentam diminuição da excessiva proliferação, via inibição da expressão de TGF- β e PDGF, e Segawa *et al.* (2001) também mostra esse efeito em cultura de células mesangiais de ratos, expostas ao nicorandil (1 μM to 1 mM). Em nosso trabalho as células de carcinoma renal humano tratadas com o nicorandil e o precursor não tiveram

alteração significativa no crescimento celular. Esse resultado divergente pode ser devido aos diferentes modelos utilizados nos outros trabalhos (*in vivo* e com cultura primária de células mesangiais) e como já se sabe os diferentes tipos celulares podem responder de maneira diferente ao mesmo estímulo.

O nicorandil inibe a apoptose em tecido cardíaco em condições de hipóxia e estresse oxidativo, e o seu envolvimento no processo de apoptose é atribuído à liberação de NO, ativação dos canais K_{ATP} mitocondriais, e também interrompendo a sinalização da cascata de apoptose, tanto por mecanismos dependentes de GMPc, quanto na inibição da atividade da caspase3 (NAGATA *et al.*, 2003). O ensaio de indução de apoptose realizado no presente trabalho mostrou que as concentrações testadas do nicorandil não induzem apoptose nas células 786-O. Todos os tratamentos, tanto com o nicorandil quanto com a N-(beta-hidroxi)etil nicotinamida apresentaram um número de células apoptóticas semelhante ao do controle, resultado esperado já que o nicorandil é citado por inibir a apoptose.

O NO pode induzir morte celular por apoptose e também por necrose, dependendo da concentração e interação com o tipo celular. Taimor *et al.* (2000) mostraram que em cardiomiócitos, em condições normais de oxigenação, o NO liberado pelo S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), induz apoptose, com correlação linear entre o aumento de apoptose e de GMPc; porém, em condição pós isquêmica ocorre uma inibição dos eventos de apoptose, sem aumento de GMPc, possivelmente porque os radicais de oxigênio formados na reoxigenação sequestram o NO. Indicando que a indução de apoptose é dependente da via NO/GMPc.

O nicorandil é dito como inibidor de apoptose no estado pós isquemia-reperfusão, por via de sinalização NO/GMPc, e parece estar envolvido em mecanismos que pré-condicionam a célula a superar o estresse e estímulos apoptóticos via ativação de K_{ATP} (NAGATA *et al.*, 2003).

Em nosso trabalho foi avaliada a expressão de dois genes da via de ativação de apoptose, *CASP8* e *CASP9*, e dois genes anti-apoptóticos, *BIRC5* e *BCL-XL*. Nagata *et al.* (2003) utilizando ensaios de ativação de proteínas caspases, mostrou que o nicorandil em condições de hipóxia inibe a ativação da proteína caspase3 (efetora) sem alterar a ativação de caspase9 (iniciadora, via intrínseca). Em nosso trabalho, concordando com a análise morfológica de indução de apoptose, não houve aumento da expressão nem do gene *CASP8* nem da *CASP9*, e os genes de inibição de apoptose também não mostraram diferença de expressão em comparação com o controle. A diferença de expressão entre os dois tratamentos,

pode ser mais um indício (além da citotoxicidade) de que a estrutura química pode apresentar diferença na ação das duas moléculas.

Em conclusão, o nicorandil e a N-(beta-hidroxietil) nicotinamida, apresentam citotoxicidade diferente, provavelmente pela presença de NO. Porém nos demais aspectos avaliados, eles não atuaram de forma diferente, mostrando que a estrutura química, independente do NO, não altera os resultados quanto indução de apoptose, genotoxicidade e proliferação celular. O uso clínico do nicorandil parece não apresentar riscos de citotoxicidade, já que em nossa avaliação ele foi citotóxico em concentração (3000 µg/mL) muito maior do que a concentração plasmática encontrada no uso clínico (0,3 µg/mL) (KINOSHITA *et al.*, 1990, FRYDMAN, 1992, HIREMATH *et al.*, 2010).

Não houve indução de apoptose, e de forma diferente do esperado não houve inibição do crescimento celular nas células 786-O. Estudos para avaliar o caráter inibitório do nicorandil no processo de apoptose em situações de estresse oxidativo e também em condições normais devem ser realizados para melhor esclarecimento deste papel, assim como estudos em outros tipos celulares para avaliar o possível uso na exagerada proliferação celular.

Agradecimentos

A CAPES/CNPq, pela bolsa de estudo e ao apoio financeiro à pesquisa. A Carolina Panis e ao Laboratório Fisiopatologia dos Radicais Livres do departamento de Ciências Patológicas do CCB-UEL, pelo auxílio no experimento de dosagem de NO. E ao professor Dr. Ângelo de Fátima pelo fornecimento do nicorandil e da N-(beta-hidroxietil) nicotinamida.

Referências

AKAO, M.; TESHIMA, Y.; MARBÁN, E. Antiapoptotic Effect of Nicorandil Mediated by Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels in Cultured Cardiac Myocytes. **Journal of the American College of Cardiology**, v.40, n.4, p.803-10, ago. 2002.

BARRETO, R. L., CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, 1046-1054, Ago.05.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n.4, p.611-622, fev. 2009.

CARREIRA, R.S. *et al.* Nicorandil protects cardiac mitochondria against permeability transition induced by ischemia- reperfusion. **J Bioenerg Biomembr**, v. 40, p. 95-102, abr 2008.

CASTANEDA, F; ROSIN-STEINER, S. Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways. **Int. J. Med. Sci.**, v. 3, p. 160-167, out. 2006.

CHEN, X. Y.; LIU, J.; XU, K. S. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III through S-phase arrest. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 61, p. 307-315, jul. 2009.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A.M. Nitric Oxide and Apoptosis: Another Paradigm for the Double-Edged Role of Nitric Oxide. **Nitric Oxide**, v.1, n.4, p.275-81, ago. 1997.

EECKHOUT, E. Nicorandil: a drug for many purposes: too good to be true? **European Heart Journal**, v. 24, p. 1282-1284, jun. 2003.

FRYDMAN, A. Pharmacokinetic Profile of Nicorandil in Humans: An Overview **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.20(Suppl.3): S34-S44, 1992.

GRIESS, J. P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "ueber einige azoverbindugen". **Chemische Berichte**, 12: 426-428, 1879.

HIREMATH, J. G. *et al.* Pharmaceutical aspects of Nicorandil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.2, p. 24-29. jun. 2010.

HUANG, Y-H, SHANG, B-Y, ZHEN Y-S. Antitumor efficacy of lidamycin on hepatoma and active moiety of its molecule. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n. 26, p. 3980-84, ago. 2005.

HWANG, S-Y. *et al.* Induction of glioma apoptosis by microglia-secreted molecules: The role of nitric oxide and cathepsin B. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1793, p.1656-1668, nov. 2009.

KASTRATI, I., *et al.* Estrogen-Induced Apoptosis of Breast Epithelial Cells Is Blocked by NO/cGMP and Mediated by Extranuclear Estrogen Receptors. **Endocrinology**, v.151, n.12, p.5206-16, dez. 2010.

KINOSHITA, M; SAKAI K. Pharmacology and therapeutic effects of Nicorandil. **Cardiovasc Drugs Ther.** v.4, p. 1075-88, ago. 1990.

- KOBAYASHI, H. *et al.* A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun**, v.3, p. 103-115, 1995.
- KRUMENACKER J. S.; MURAD, F. NO-cGMP signaling in development and stem cells. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.87, p.311–314, jan. 2006.
- LU, C. Nicorandil Improves Post-Ischemic Myocardial Dysfunction in Association With Opening the Mitochondrial K_{ATP} Channels and Decreasing Hydroxyl Radicals in Isolated Rat Hearts. **Circulation Journal**, v.70, p.1650-1654, dez. 2006.
- MASRI, F. Role of nitric oxide and its metabolites as potential markers in lung cancer. **Annals of Thoracic Medicine**, v.5. n.3, p.123–127, abr. 2010.
- MUJOO, K., *et al.* Role of soluble guanylyl cyclase–cyclic GMP signaling in tumor cell proliferation. **Nitric Oxide**, v.22, p. 43–50, jan. 2010.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v.43, p.109-142, jun. 1991.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, dez. 1983.
- NAGATA, K. *et al.* Nicorandil inhibits oxidative stress-induced apoptosis in cardiac myocytes through activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and a nitrate-like effect. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, p. 1505-1512, dez. 2003.
- NISHIKAWA, S. *et al.* Nicorandil regulates Bcl-2 family proteins and protects cardiac myocytes against hypoxia-induced apoptosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 40, n.4, p.510-9, abr. 2006.
- NGUYEN, T. *et al.* DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. **Biochemistry**, v. 89, p. 3030-3034, abr. 1992.
- PANIS C, *et al.* Trypanosoma cruzi: Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp Parasitol**, v.127, n°1, p.58-65, jul. 2010.
- PETERS, H. *et al.* NO mediates antifibrotic actions of L-arginine supplementation following induction of anti-thy1 glomerulonephritis. **Kidney International**, v.64, n.2, p.509-18, ago. 2003.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007, maio, 2001.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1-10, maio, 2002.

ROVOZZO, G.C; BURKE, C.N. **A manual of basic virological techniques**. p.159, 1973.

SATO, T. *et al.* Nicorandil, a Potent Cardioprotective Agent, Acts by Opening Mitochondrial ATP - Dependent Potassium Channels. **Journal of the American College of Cardiology**, v.35, n.2, p.514-8, fev. 2000.

SEGAWA, K. *et al.* Inhibitory Effects of Nicorandil on Rat Mesangial Cell Proliferation via the Protein Kinase G Pathway. **Nephron**, v.87, n.3, p.263-8, mar. 2001.

SETH, P.; FUNG H.L. Biochemical characterization of a membrane-bound enzyme responsible for generating nitric oxide from nitroglycerin in vascular smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol**, v.46, p.1481-6, out. 1993.

SIMPSON, D.; WELLINGTON, K. Nicorandil: a review of its use in the management of stable angina pectoris, including high-risk patients. **Drugs**, v.64, n.17, p. 1941-55. 2004.

SINGH, N.P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v.175, p.184–191, mar. 1988.

SUDO, H. *et al.* Nicorandil Improves Glomerular Injury in Rats With Mesangioproliferative Glomerulonephritis via Inhibition of Proliferative and Profibrotic Growth Factors. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.111, n.1, p.53-9, set. 2009.

SUGAYA, S; NAKANISHI, H; TANZAWA, H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. **Mutation Res.**, v. 578, p. 327–332, out. 2005.

TAIMOR, G.; HOFSTAETTER, B.; PIPER H.M. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. **Cardiovascular Research**, v.45, p. 588–594, 2000.

TICE, R.R. *et al.* Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p. 206-221, jun. 2000.

TSUBOY, M.S. *et al.* In Vitro Evaluation of the Genotoxic Activity and Apoptosis Induction of the Extracts of Roots and Leaves from the Medicinal Plant *Coccoloba mollis* (Polygonaceae). **Journal of Medicinal Food**, v.13, p.503-8, jun. 2010.

WANG, P. G. *et al.* Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 102, p.1091-1134, jun. 2002.

WINK, D.A. *et al.* The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v.19, n.5, p.711-721, maio, 1998.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-BRYAN, L., *et al.* Toward Understanding the Assembly and Structure of KATP Channels. **Physiological Reviews**, v.78, n. 1, p.227-245, jan. 1998.
- AKAO, M.; TESHIMA, Y.; MARBÁN, E. Antiapoptotic Effect of Nicorandil Mediated by Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels in Cultured Cardiac Myocytes. **Journal of the American College of Cardiology**, v.40, n.4, p.803-10, ago. 2002.
- BAKER, J. W., EASTY, D. M. Hydrolytic decomposition of esters of nitric acid. Part II. The effects of structural and solvent changes on the substitution and elimination reactions which occur in the hydrolysis of primary, secondary, and tertiary alkyl nitrates. **J. Chem. Soc.**, p.1208-1216, 1952.
- BARIŠIĆ, K.; PETRIK, J.; RUMORA, L. **Biochemistry of apoptotic cell death**, v.53, p.151-164, 2003.
- BARRETO, R. L., CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, no. 6, 1046-1054, ago. 2005.
- BAUKROWITZ, T.; FAKLER, B. K_{ATP} channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, 5842-5848, jul.2000.
- BURLINSON, B. *et al.* Fourth International Workshop on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research**, v. 627, p. 31-35, fev. 2007
- BURZ, C.; BERINDAN-NEAGOE, I.; BALACESCU, O.; IRIMIE, A. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. **Acta Oncologica**, v.48, p.811-821, 2009.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n.4, p.611-622, fev. 2009.
- CAI, T.B.; LU, D.; WANG, P.G. N-hydroxyguanidines as substrates of nitric oxide synthases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.5, n.7, p.721-36. 2005.
- CAPELLOS, C., *et al.* Basic Hydrolysis of Glycerol Nitrate Esters. III. Trinitroglycerin. **Int. J. Chem. Kinetics**, v. 16, p.1027-1051, ago. 1984.
- CARREIRA, R.S. *et al.* Nicorandil protects cardiac mitochondria against permeability transition induced by ischemia- reperfusion. **J Bioenerg Biomembr.**, v. 40, p. 95-102, abr. 2008.
- CASTANEDA, F; ROSIN-STEINER, S. Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways. **Int. J. Med. Sci.**, v. 3, p. 160-167,

- CHEN, X. Y.; LIU, J.; XU, K. S. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III through S-phase arrest. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 61, p. 307–315, jul. 2009out. 2006.
- CHONG, S.; FUNG H.L. Biochemical and pharmacological interactions between nitroglycerin and thiols. Effects of thiol structure on nitric oxide generation and tolerance reversal. **Biochem Pharmacol.**, v.42, p. 1433-9, set. 1991.
- CORY S.; HUANG D.C.S.; ADAMS J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, v.22, p.8590–8607, nov. 2003.
- COSTA, A. D. T., *et al.* The direct physiological effects of mitoK_{ATP} opening on heart mitochondria. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.290. p. H406–H415, ago. 2005.
- DEVERAUX, Q. L.; REED J. C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. **Genes and development**, v. 13, p. 239-252, 1999.
- DIMMELER, S.; ZEIHNER, A.M. Nitric Oxide and Apoptosis: Another Paradigm for the Double-Edged Role of Nitric Oxide. **Nitric Oxide**, v.1, n.4, p.275-81, ago. 1997.
- EECKHOUT, E. Nicorandil: a drug for many purposes: too good to be true? **European Heart Journal**, v. 24, p. 1282-1284, jun. 2003.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, n.4, p.495-516, 2007.
- FEELISCH, M.; OSTROWSKI, J.; NOACK, E. On the mechanism of NO release from sydnonimines. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.14 Suppl 11:S13-22. 1989.
- FENECH, M.*et al.* The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, p. 271-283, jul. 1999
- FRYDMAN, A. Pharmacokinetic Profile of Nicorandil in Humans: An Overview **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.20(Suppl.3):S34-S44, 1992.
- GANTENBEIN, R.B. *et al.* Accuracy of three techniques to determine cell viability in 3D tissues or scaffolds. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v.14, n.4, p.353-8, dez. 2008.
- GRIESS, J. P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt “ueber einige azoverbindugen”. **Chemische Berichte**, 12: 426-428, 1879.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Apoptosis: Programmed Cell Death, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-43, jan. 2007.
- HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v.119, p.203-210, maio 1989.
- HARTMANN, A, SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA- effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, v.90, p.83-88, fev. 1997.

HIREMATH, J. G. *et al.* Pharmaceutical aspects of Nicorandil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.2, p. 24-29, jun. 2010.

HONEYMAN, J; MORGAN, J.W. Sugar nitrates. **Adv Carbohydr Chem.**, v. 12, p. 117-35. 1957.

HUANG, Y-H, SHANG, B-Y, ZHEN Y-S. Antitumor efficacy of lidamycin on hepatoma and active moiety of its molecule. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n. 26, p. 3980-84, ago. 2005.

HWANG, S-Y. *et al.* Induction of glioma apoptosis by microglia-secreted molecules: The role of nitric oxide and cathepsin B. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1793, p.1656–1668, nov. 2009.

IGNARRO, L.J.; GRUETTER, C.A. Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitrosothiols. **Biochim Biophys Acta**, p.221-31, ago. 1980.

INOUE, I., *et al.* ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. **Nature**, v.352, p. 244-247, jul. 1991

ISHII, H. *et al.* Efficacy of oral nicorandil in patients with end-stage renal disease: a retrospective chart review after coronary angioplasty in Japanese patients receiving hemodialysis. **Clinical Therapeutics**, v.29, n.1, p.110-22, jan. 2007.

JEFFERSON, J.A.; SHANKLAND, S.J.; PICHLER, R.H. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. **Kidney International**, v.74, n.1, p.22-36, jul. 2008.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v.4, n.2, p.139-163, 2005.

KASTRATI, I., *et al.* Estrogen-Induced Apoptosis of Breast Epithelial Cells Is Blocked by NO/cGMP and Mediated by Extranuclear Estrogen Receptors. **Endocrinology**, v.151, n.12, p.5206-16, dez. 2010.

KERR, L.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissues kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26, p.239, 1972.

KINOSHITA, M; SAKAI K. Pharmacology and therapeutic effects of Nicorandil. **Cardiovasc Drugs Ther.**, v.4, p. 1075-88, ago. 1990.

KOBAYASHI, H. *et al.* A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun**, v.3, p. 103-115, 1995.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p.155-166, nov. 2000

KRUMENACKER J. S.; MURAD, F. NO-cGMP signaling in development and stem cells. **Molecular Genetics and Metabolism.**, v.87, p.311–314, jan. 2006.

- LALA, P.K. *et al.* Significance of nitric oxide in carcinogenesis, tumor progression and cancer therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.17, n.1, p.1-6, mar. 1998.
- LAUNAY, S.; HERMINE, O.; FONTENAY, M.; KROEMER G.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. **Vital functions for lethal caspases**, v.24, p.5137-5148, 2005.
- LU, C. Nicorandil Improves Post-Ischemic Myocardial Dysfunction in Association With Opening the Mitochondrial K_{ATP} Channels and Decreasing Hydroxyl Radicals in Isolated Rat Hearts. **Circulation Journal**, v.70, p.1650-1654, dez. 2006.
- MA, F. *et al.* Functional Polymorphism -31C/G in the Promoter of BIRC5 Gene and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma among Chinese. **PLoS ONE**, v.6, p.1-8, fev. 2001.
- MACIEL, E. N.; VERCESI A. E.; CASTILHO R. F. Oxidative stress in Ca²⁺-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. **Journal of Neurochemistry**, v.79, p.1237-1245, out. 2001.
- MARKHAM, A. *et al.* An Updated Review of its Use in Ischaemic Heart Disease with Emphasis on its Cardioprotective Effects. **Adis Drug Evaluation**, v.4, p. 955-974, out. 2000.
- MASRI, F. Role of nitric oxide and its metabolites as potential markers in lung cancer. **Annals of Thoracic Medicine**. v.5. n.3, p.123–127, abr. 2010.
- MAYER, B.;BERETTA, M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. **British Journal of Pharmacology**, v.155, p.170-184, set. 2008.
- MUJOO, K., *et al.* Role of soluble guanylyl cyclase–cyclic GMP signaling in tumor cell proliferation. **Nitric Oxide**, v.22, p. 43–50, jan. 2010.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v.43, p.109-142, jun. 1991.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29–60, nov. 2000.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, dez. 1983.
- NAGATA, K. *et al.* Nicorandil inhibits oxidative stress-induced apoptosis in cardiac myocytes through activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and a nitrate-like effect. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, p. 1505-1512, dez. 2003.
- NGUYEN, T. *et al.* DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. **Biochemistry**, v. 89, p. 3030-3034, abr. 1992.
- NISHIKAWA, S. *et al.* Nicorandil regulates Bcl-2 family proteins and protects cardiac myocytes against hypoxia-induced apoptosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 40, n.4, p.510-9. abr. 2006.

NOMA A. ATP-regulated KC channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305. p.147– 48, set. 1983.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. **Nature reviews**, v.4, p.592-603, 2004.

OLSON, S.Y.; GARBÁN, H.J. Regulation of Apoptosis-Related Genes by Nitric Oxide in Cancer. **Nitric Oxide**, v.19, n.2, p.170-6, set. 2008

OSINSKI, M. T.; RAUCH, B. H.; SCHROR, K. Antimitogenic Actions of Organic Nitrates Are Potentiated by Sildenafil and Mediated Via Activation of Protein Kinase A. **Mol. Pharmacol**, v.59, p. 1044–1050, jan. 2001

PANIS C, *et al.* Trypanosoma cruzi: Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp Parasitol.**, v.127, n.1, p.58-65, jul. 2010.

PETERS, H. *et al.* NO mediates antifibrotic actions of L-arginine supplementation following induction of anti-thy1 glomerulonephritis. **Kidney International**, v.64, n.2, p.509-18, ago. 2003.

PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1644, p. 83– 94, 2004.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007, maio, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1-10, maio, 2002.

RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

ROVOZZO, G.C; BURKE, C.N. **A manual of basic virological techniques**. p.159, 1973.

SATO, T. *et al.* Nicorandil, a Potent Cardioprotective Agent, Acts by Opening Mitochondrial ATP - Dependent Potassium Channels. **Journal of the American College of Cardiology**. v.35, n.2, p.514-8, fev. 2000.

SEGAWA, K. *et al.* Inhibitory Effects of Nicorandil on Rat Mesangial Cell Proliferation via the Protein Kinase G Pathway. **Nephron**. v.87, n.3, p.263-8, mar. 2001.

SEINO, S. ATP-sensitive potassium channels: A Model of Heteromultimeric Potassium Channel/Receptor Assemblies. **Annual Reviews Physiol**. v. 61, p.337–62, mar. 1999.

SETH, P.; FUNG H.L. Biochemical characterization of a membrane-bound enzyme responsible for generating nitric oxide from nitroglycerin in vascular smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol.**, v.46, p.1481-6, out. 1993.

SIMPSON, D.; WELLINGTON, K. Nicorandil: a review of its use in the management of stable angina pectoris, including high-risk patients. **Drugs**, v.64, n.17, p. 1941-55. 2004.

SINGH, N.P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.**, v.175, p.184–191, mar. 1988.

SOBEY, C. G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.21, p.28-38, jan. 2001.

SUDO, H.*et al.* Nicorandil Improves Glomerular Injury in Rats With Mesangioproliferative Glomerulonephritis via Inhibition of Proliferative and Profibrotic Growth Factors. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.111, n.1, p.53-9, set. 2009.

SUGAYA, S; NAKANISHI, H; TANZAWA, H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. **Mutation Res.**, v. 578, p. 327–332, out. 2005.

SUN, X. M. *et al.*, Bcl-2 and Bcl-xL Inhibit CD95-mediated Apoptosis by Preventing

Mitochondrial Release of Smac/DIABLO and Subsequent Inactivation of X-linked Inhibitor-of-Apoptosis Protein. **JBC Papers in Press**, v. 277, n.13, p. 11345-51, mar. 2002.

TAIMOR, G.; HOFSTAETTER, B.; PIPER H.M. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. **Cardiovascular Research**, v.45, p. 588–594, 2000.

TICE, R.R. *et al.* Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p. 206-221, jun. 2000.

TSUBOY, M.S. *et al.* In Vitro Evaluation of the Genotoxic Activity and Apoptosis Induction of the Extracts of Roots and Leaves from the Medicinal Plant *Coccoloba mollis* (Polygonaceae). **Journal of Medicinal Food**, v.13, p.503-8, jun. 2010.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v.29, p.151–159, abr. 2005.

VELLONEN, K-S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, p.181-188, out. 2004.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology**, v.84, p.627-639, 2005.

YIM, C.Y. *et al.* Macrophage Nitric Oxide Synthesis Delays Progression of Ultraviolet Light-induced Murine Skin Cancers. **Cancer Research**, v.53, n.22, p.5507-11, nov.1993.

WANG, P. G. *et al.* Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 102, p.1091-1134, jun. 2002.

WEBSTER, K. A., *et al.* Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. **The Journal of Clinical Investigation**, v.104, n°3, p.239-252, ago. 1999.

WINK, D.A. *et al.* The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v.19, n.5, p.711-721, maio, 1998.

WITTE, I. *et al.* Genetic Toxicity Assessment: Employing the best science for human evaluation Part III: The Comet Assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, v. 97, n.1, p. 21-26, maio. 2007

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p.124-128, jun. 2004.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v.92, p.57-70, 2001.

ANEXOS

ANEXO A

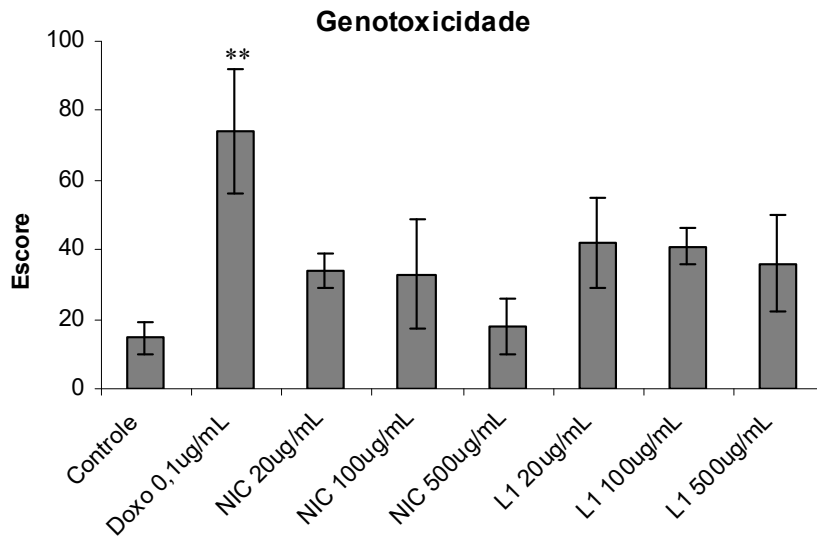


Figura 8 - Escore médio dos cometas observados nas células 786-O, após 3 horas de tratamento com nicorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1). (100 células analisadas por tratamento) ** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$

Tabela 3 - Valores médios das absorvâncias obtidas no teste de citotoxicidade. Células 786-O tratadas com nicorandil (2-NN) por 24, 48 e 72h.

Citotoxicidade – Nicorandil			
<i>Tratamentos</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>
<i>Controle</i>	0,604 ± 0,250	0,708 ± 0,214	0,959 ± 0,743
<i>Doxo 0,5 µg /mL</i>	0,580 ± 0,228	0,373 ± 0,051**	0,439 ± 0,300**
<i>2-NN 100 µg /mL</i>	0,579 ± 0,235	0,631 ± 0,233	0,894 ± 0,665
<i>2-NN 500 µg/mL</i>	0,561 ± 0,253	0,653 ± 0,249	0,896 ± 0,691
<i>2-NN 1000 µg/mL</i>	0,517 ± 0,234	0,578 ± 0,251	0,770 ± 0,584
<i>2-NN 2000 µg/mL</i>	0,446 ± 0,226**	0,440 ± 0,179**	0,538 ± 0,432**
<i>2-NN 3000 µg/MI</i>	0,399 ± 0,194**	0,340 ± 0,092**	0,374 ± 0,409**

(Média das absorvâncias ± desvio padrão). ** Diferença estatisticamente significativa $P < 0.01$. Controle 1%DMSO.

Tabela 4 - Valores médios das absorvâncias obtidas no teste de citotoxicidade. Células 786-O tratados com N-(beta-hidroxietyl) nicotinamida por 24, 48 e 72h.

Citotoxicidade - N-(beta-hidroxietyl) nicotinamida			
Tratamentos	24h	48h	72h
Controle	0,575 ± 0,147	0,663 ± 0,179	1,171 ± 0,141
Doxo 0,5 µg/mL	0,461 ± 0,115	0,381 ± 0,051**	0,476 ± 0,185**
L1 1000 µg/mL	0,480 ± 0,130	0,672 ± 0,193	1,339 ± 0,214
L1 2000 µg/mL	0,452 ± 0,098	0,573 ± 0,174	1,052 ± 0,202
L1 3000 µg/mL	0,356 ± 0,056**	0,433 ± 0,136**	0,744 ± 0,117**

(Média das absorvâncias ± desvio padrão). ** Diferença estatisticamente significativa P<0.01. Controle 1,5%DMSO. N-(beta-hidroxietyl) nicotinamida (L1)

Tabela 5 - Viabilidade Celular em porcentagem (%) calculada a partir das absorvâncias obtida pelo teste de citotoxicidade MTT. Células 786-O tratadas com o nicorandil (2-NN) por 24, 48 e 72h. Considerando controle 100%.

Viabilidade Celular – Nicorandil			
Tratamentos	24h	48h	72h
Controle	100	100	100
Doxo 0,5 µg/mL	97 ± 6	50 ± 11**	54 ± 27**
2-NN 100 µg/mL	95 ± 1	89 ± 23	105 ± 22
2-NN 500 µg/mL	89 ± 7	89 ± 12	110 ± 35
2-NN 1000 µg/mL	81 ± 8	76 ± 18	95 ± 33
2-NN 2000 µg/mL	64 ± 16**	56 ± 12**	54 ± 12**
2-NN 3000 µg/mL	57 ± 11**	42 ± 1**	39 ± 28**

(% média ± desvio padrão). ** Diferença estatisticamente significativa P<0.01. Controle 1%DMSO.

Tabela 6 - Viabilidade Celular em porcentagem (%) calculada a partir das absorbâncias obtida pelo teste de citotoxicidade MTT. Células 786-O tratadas com N-(beta-hidroxietil) nicotinamida por 24, 48 e 72h. Considerando controle 100%.

Viabilidade Celular			
N-(beta-hidroxietil) nicotinamida			
Tratamentos	24h	48h	72h
<i>Controle</i>	100	100	100
<i>Doxo 0,5 µg/mL</i>	78 ± 10	55 ± 14**	36 ± 14**
<i>L1 1000 µg/mL</i>	82 ± 16	101 ± 3	115 ± 5
<i>L1 2000 µg/mL</i>	76 ± 4	84 ± 6	89 ± 10
<i>L1 3000 µg/mL</i>	58 ± 15**	60 ± 8**	61 ± 9**

(% média ± desvio padrão). ** Diferença estatisticamente significativa P<0.01. Controle 1,5%DMSO. N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1)

Tabela 7 - Liberação média de NO na cultura de célula 786-O tratadas com nicorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1), nos tempos de exposição de 1, 12, 24 e 48h.

Liberação de NO na cultura dos tratamentos (µM)				
Tratamentos	1h	12h	24h	48h
<i>Controle</i>	32,3 ± 10,3	34,8 ± 19,1	52,6 ± 36,6	42,4 ± 1,8
<i>Doxo 0,05 µg/mL</i>	21,5 ± 8,3	51,1 ± 9,5	33,5 ± 8,3	36,3 ± 22,4
<i>2-NN 20 µg/mL</i>	56,1 ± 12,6	54,8 ± 4,0	70,8 ± 17,7	41,8 ± 8,0
<i>2-NN 100 µg/mL</i>	76,9 ± 23,2	98,9 ± 55,6	111,2 ± 61,9	121,2 ± 32,1
<i>2-NN 500 µg/mL</i>	285,3 ± 19,5***	289,7 ± 63,5***	341,8 ± 63,6***	325,8 ± 134,8***
<i>L1 20 µg/mL</i>	41,4 ± 21,1	27,7 ± 10,0	33,2 ± 17,4	53,0 ± 44,1
<i>L1 100 µg/mL</i>	89,7 ± 31,8	19,5 ± 2,0	45,3 ± 0,8	29,0 ± 20,4
<i>L1 500 µg/mL</i>	39,0 ± 26,3	48,9 ± 3,7	23,8 ± 4,8	24,6 ± 0,6

(Controle 0,25%DMSO), *** Diferença estatisticamente significativa P<0.001. Valores de dosagem indireta de NO.

Tabela 8 - Dosagem de NO em meio de cultura. Alíquotas para dosagem retirada nos tempos 1, 12, 24 e 48h de exposição. ($\mu\text{M} \pm$ desvio padrão).

Dosagem de NO no meio de cultura - tratamentos e controles					
		1h	12h	24h	48h
Sem células	Meio	37,6 \pm 23,4	29,8 \pm 7,1	30,8 \pm 11,2	23,6 \pm 9,1
	Controle	68,3 \pm 43,3	46,2 \pm 5,4	45,7 \pm 20,3	47,3 \pm 13,4
	2-NN 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	48,3 \pm 14,8	85,2 \pm 30,7	55,6 \pm 0,8	59,5 \pm 4,8
	2-NN 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	113,4 \pm 57,6	89,0 \pm 45,0	99,7 \pm 36,4	96,7 \pm 92,1
	2-NN 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	383,0 \pm 73,0***#	274,2 \pm 135,9**	- \pm -	382,8 \pm 56,6***
	L1 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	33,6 \pm 9,4	31,1 \pm 5,5	36,4 \pm 27,8	53,7 \pm 32,6
	L1 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30,6 \pm 17,1	38,8 \pm 18,3	25,2 \pm 2,5	54,8 \pm 16,0
	L1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	60,3 \pm 35,8	45,0 \pm 24,3	29,3 \pm 14,9	33,4 \pm 17,7
Com células	Célula	25,0 \pm 6,5	34,0 \pm 26,9	40,0 \pm 11,4	21,4 \pm 2,3
	Controle	32,3 \pm 10,3	34,8 \pm 19,1	52,6 \pm 36,6	42,4 \pm 1,8
	2-NN 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	56,1 \pm 12,6	54,8 \pm 4,0	70,8 \pm 17,7	41,8 \pm 8,0
	2-NN 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	76,9 \pm 23,2	98,9 \pm 55,6	111,2 \pm 61,9	121,2 \pm 32,1
	2-NN 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	285,3 \pm 19,5***#	289,7 \pm 63,5***	341,8 \pm 63,6***	325,8 \pm 134,8***
	L1 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	41,4 \pm 21,1	27,7 \pm 10,0	33,2 \pm 17,4	53,0 \pm 44,1
	L1 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	89,7 \pm 31,8	19,5 \pm 2,0	45,3 \pm 0,8	29,0 \pm 20,4
	L1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	39,0 \pm 26,3	48,9 \pm 3,7	23,8 \pm 4,8	24,6 \pm 0,6

Sem células: Meio (apenas meio de cultura), Controle (0,25% DMSO), nicorandil (2-NN), N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1); *Com células* 786-O: Célula (células + meio de cultura), Controle (0,25% DMSO), nicorandil (2-NN), N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1). (** Diferença estatisticamente significativa $P < 0,01$, *** Diferença estatisticamente significativa $P < 0,001$, Controle vs. Tratamento) (# Diferença estatisticamente significativa $P < 0,05$, tratamento com célula vs. tratamento sem célula)

Tabela 9 - Número médio de células obtidas na contagem em câmara de *Neubauer*. Células 786-O tratadas com nicorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1), nos tempos de tratamento 24, 48, 72 e 96h. (Número médio de células $\times 10^4 \pm$ desvio padrão),

Proliferação Celular				
Tratamentos	24h	48h	72h	96h
Controle	8,2 \pm 4,0	23,7 \pm 9,8	40,4 \pm 38,1	80,9 \pm 31,4
Doxo 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3,7 \pm 2,1**	3,6 \pm 3,1**	6,1 \pm 2,9**	3,9 \pm 3,4**
2-NN 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,4 \pm 3,9	17,0 \pm 14,7	32,5 \pm 12,1	85,1 \pm 15,2
2-NN 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9,2 \pm 2,4	15,6 \pm 3,5	30,3 \pm 27,9	58,3 \pm 42
2-NN 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5,3 \pm 2,3	14,5 \pm 2,4	28,2 \pm 17,7	50,7 \pm 24,3
L1 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8,0 \pm 0,7	21,7 \pm 9,5	38,1 \pm 27,9	62,9 \pm 16,8
L1 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6,3 \pm 2,4	21,8 \pm 9,7	36,9 \pm 23,0	70,9 \pm 24,7
L1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8,3 \pm 3,3	16,9 \pm 2,4	34,3 \pm 19,0	65,8 \pm 13,2

** Diferença estatisticamente significativa $P < 0,01$

Tabela 10 - Avaliação de Indução de Apoptose, das células 786-O tratadas com nicorandil (2-NN) e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (L1) por 24h.

Indução de Apoptose				
Tratamentos	Total de Células analisadas	Total de Células apoptóticas	Frequência de células apoptóticas (%) #	Médias das 3 repetições
Controle	1500	8	0,53	2,7 ± 3,8
Camptotecina 20 µg/mL	1500	230	15,33	76,7 ± 44,0***
2-NN 20 µg/mL	1500	2	0,13	0,7 ± 0,6
2-NN 100 µg/mL	1500	2	0,13	0,7 ± 1,2
2-NN 500 µg/mL	1500	11	0,73	3,7 ± 4,7
L1 20 µg/mL	1500	11	0,73	3,7 ± 2,1
L1 100 µg/mL	1500	7	0,47	2,3 ± 2,3
L1 500 µg/mL	1500	3	0,20	1,0 ± 1,0

Controle = 0,25% DMSO; # (Total de células apoptóticas encontradas/ total de células analisadas)*100; (Média ± desvio padrão). *** Diferença estatisticamente significativa P<0.001

Tabela 11 - Dados para o cálculo da Razão referente à expressão relativa do gene *CASP8* de células 786-O, tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL. Conforme método de Pfaffl, 2001. *GAPDH* = gene normalizador.

Nicorandil (500 µg/mL)									
	Eficiência Controle	Eficiência Tratam	Ct Contr	Ct Tratam	Media E [(Cnt+Trt)/2]	DeltaCt (Cnt-Trt)	E^{ΔCt}	Razão	Razão Média $\bar{x} \pm SD$
Repetição 1									
CASP 8	1,87	1,75	24,52	24,16	1,81	0,36	1,24	1,336	1,132 ± 0,289
GAPDH	1,92	1,94	16,47	16,58	1,93	-0,12	0,93		
Repetição 2									
CASP 8	1,79	1,80	25,11	24,40	1,80	0,71	1,51	0,927	
GAPDH	1,95	1,88	17,06	16,30	1,91	0,76	1,63		
N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (500 µg/mL)									
	Eficiência Controle	Eficiência Tratam	Ct Contr	Ct Tratam	Media E [(Cnt+Trt)/2]	DeltaCt (Cnt-Trt)	E^{ΔCt}	Razão	Razão Média $\bar{x} \pm SD$
Repetição 1									
CASP 8	1,87	1,84	24,52	25,75	1,86	-1,23	0,47	0,894	0,943 ± 0,068
GAPDH	1,92	1,78	16,47	17,52	1,85	-1,05	0,52		
Repetição 2									
CASP 8	1,79	1,86	25,11	24,71	1,83	0,40	1,27	0,991	
GAPDH	1,95	1,85	17,06	16,67	1,90	0,39	1,28		

Fórmula para o cálculo: Razão = $\frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}} (\bar{x}_{\text{controle}} - \bar{x}_{\text{tratado}})}}{(E_{\text{gene ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}} (\bar{x}_{\text{controle}} - \bar{x}_{\text{tratado}})}}$ (PFAFFL, 2001)

Tabela 12 - Dados para o cálculo da Razão referente à expressão relativa do gene *CASP9* de células 786-O, tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL. Conforme método de Pfaffl, 2001. *GAPDH* = gene normalizador.

Nicorandil (500 µg/mL)									Razão Média $\bar{x} \pm SD$	
Eficiência Contr	Eficiência Tratam	Ct Contr	Ct Tratam	Media E [(Cnt+Trt)/2]	DeltaCt (Cnt-Trt)	$E^{\Delta Ct}$	Razão			
Repetição 1									1,202	1,056 ± 0,206
CASP 9	1,79	1,88	24,66	24,50	1,83	0,16	1,10			
GAPDH	1,97	1,94	15,97	16,10	1,95	-0,13	0,92			
Repetição 2									0,910	
CASP 9	1,74	1,88	25,11	24,41	1,81	0,70	1,52			
GAPDH	2,00	1,88	16,54	15,77	1,94	0,77	1,66			
N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (500 µg/mL)									Razão Média $\bar{x} \pm SD$	
Eficiência Contr	Eficiência Tratam	Ct Contr	Ct Tratam	Media E [(Cnt+Trt)/2]	DeltaCt (Cnt-Trt)	$E^{\Delta Ct}$	Razão			
Repetição 1									1,010	0,928 ± 0,115
CASP 9	1,79	1,89	24,66	25,64	1,84	-0,98	0,55			
GAPDH	1,97	1,80	15,97	16,93	1,88	-0,96	0,55			
Repetição 2									0,847	
CASP 9	1,74	1,75	25,11	24,94	1,75	0,16	1,10			
GAPDH	2,00	1,88	16,54	16,16	1,94	0,39	1,29			

Fórmula para o cálculo: Razão = $\frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}} (\bar{x}_{\text{controle}} - \bar{x}_{\text{tratam}})}}{(E_{\text{gene ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}} (\bar{x}_{\text{controle}} - \bar{x}_{\text{tratam}})}}$
(PFAFFL, 2001)

Tabela 13 - Dados para o cálculo da Razão referente à expressão relativa do gene *BCL-XL* de células 786-O, tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL. Conforme método de Pfaffl, 2001. *GAPDH* = gene normalizador.

Nicorandil (500 µg/mL)										
	<i>Eficiência</i> <i>Contr</i>	<i>Eficiência</i> <i>Tratam</i>	<i>Ct</i> <i>Contr</i>	<i>Ct</i> <i>Tratam</i>	<i>Media E</i> [(<i>Cnt</i> + <i>Trt</i>)/2]	<i>DeltaCt</i> (<i>Cnt</i> - <i>Trt</i>)	$E^{\Delta Ct}$	<i>Razão</i>	<i>Razão</i> <i>Média</i> $\bar{x} \pm SD$	
Repetição 1										
<i>BCL-XL</i>	1,83	1,80	22,42	22,46	1,82	-0,03	0,98	1,067	1,151 ± 0,119	
<i>GAPDH</i>	1,97	1,94	15,97	16,10	1,95	-0,13	0,92			
Repetição 2										
<i>BCL-XL</i>	1,77	1,81	23,29	22,05	1,79	1,24	2,06	1,235		
<i>GAPDH</i>	2,00	1,88	16,54	15,77	1,94	0,77	1,66			
N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (500 µg/mL)										
	<i>Eficiência</i> <i>Contr</i>	<i>Eficiência</i> <i>Tratam</i>	<i>Ct</i> <i>Contr</i>	<i>Ct</i> <i>Tratam</i>	<i>Media E</i> [(<i>Cnt</i> + <i>Trt</i>)/2]	<i>DeltaCt</i> (<i>Cnt</i> - <i>Trt</i>)	$E^{\Delta Ct}$	<i>Razão</i>	<i>Razão</i> <i>Média</i> $\bar{x} \pm SD$	
Repetição 1										
<i>BCL-XL</i>	1,83	1,80	22,42	24,16	1,82	-1,74	0,35	0,649	0,801 ± 0,214	
<i>GAPDH</i>	1,97	1,80	15,97	16,93	1,88	-0,96	0,55			
Repetição 2										
<i>BCL-XL</i>	1,77	1,77	23,29	22,92	1,77	0,36	1,23	0,952		
<i>GAPDH</i>	2,00	1,88	16,54	16,16	1,94	0,39	1,29			

Fórmula para o cálculo: Razão = $\frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}} (\bar{x}_{\text{controle}} - \bar{x}_{\text{tratado}})}}{(E_{\text{gene ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}} (\bar{x}_{\text{controle}} - \bar{x}_{\text{tratado}})}}$
(PFAFFL, 2001)

Tabela 14 - Dados para o cálculo da Razão referente à expressão relativa do gene *BIRC5* de células 786-O, tratadas por 12 horas com Nicorandil 500 µg/mL e N-(beta-hidroxietil) nicotinamida 500 µg/mL. Conforme método de Pfaffl, 2001. *GAPDH* = gene normalizador.

Nicorandil (500 µg/mL)										
	<i>Eficiência Contr</i>	<i>Eficiência Tratam</i>	<i>Ct Contr</i>	<i>Ct Tratam</i>	<i>Media E [(Cnt+Trt)/2]</i>	<i>DeltaCt (Cnt-Trt)</i>	<i>E^{Δct}</i>	<i>Razão</i>	<i>Razão Média $\bar{x} \pm SD$</i>	
Repetição 1										
<i>BIRC5</i>	1,72	1,87	21,88	21,73	1,79	0,15	1,09	1,179	1,068 ± 0,156	
<i>GAPDH</i>	1,92	1,94	16,48	16,60	1,93	-0,12	0,92			
Repetição 2										
<i>BIRC5</i>	1,86	1,84	22,30	21,56	1,85	0,74	1,58	0,958		
<i>GAPDH</i>	1,92	1,88	17,11	16,33	1,90	0,78	1,65			
N-(beta-hidroxietil) nicotinamida (500 µg/mL)										
	<i>Eficiência Contr</i>	<i>Eficiência Tratam</i>	<i>Ct Contr</i>	<i>Ct Tratam</i>	<i>Media E [(Cnt+Trt)/2]</i>	<i>DeltaCt (Cnt-Trt)</i>	<i>E^{Δct}</i>	<i>Razão</i>	<i>Razão Média $\bar{x} \pm SD$</i>	
Repetição 1										
<i>BIRC5</i>	1,72	1,88	21,88	22,89	1,80	-1,01	0,55	1,074	0,989 ± 0,121	
<i>GAPDH</i>	1,92	1,78	16,48	17,56	1,85	-1,08	0,51			
Repetição 2										
<i>BIRC5</i>	1,86	1,84	22,30	22,04	1,85	0,26	1,17	0,903		
<i>GAPDH</i>	1,92	1,85	17,11	16,70	1,89	0,41	1,30			

Fórmula para o cálculo: Razão = $\frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}} (\bar{x}_{\text{controle}} - \bar{x}_{\text{tratado}})}}{(E_{\text{gene ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}} (\bar{x}_{\text{controle}} - \bar{x}_{\text{tratado}})}}$ (PFAFFL, 2001)

Tabela 15 - Dados Farmacológicos do nicorandil

Dados Farmacológicos do Nicorandil	
Comprimido	5-40mg
Injeção Intravenosa	0,03-3mg/Kg
Absorção gastrointestinal	≈ 100%
Concentração plasmática (20mg)	0,3 µg/mL

(KINOSHITA *et al.*, 1990, FRYDMAN, 1992, HIREMATH *et al.*, 2010).