

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Características genéticas e citogenéticas do melanoma murino B16-F10 e respostas *in vitro* frente ao tratamento com CuShydPhen nas linhagens TG180 e B16-F10

Pedro Henrique Alves Machado

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

Novembro - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Características genéticas e citogenéticas do melanoma murino B16-F10 e respostas *in vitro* frente ao tratamento com CuShydPhen nas linhagens TG180 e B16-F10

Pedro Henrique Alves Machado

Orientador: Robson José Oliveira Júnior

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia – MG

Novembro– 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Características genéticas e citogenéticas do melanoma murino B16-F10 e respostas *in vitro* frente ao tratamento com CuShydPhen nas linhagens TG180 e B16-F10

Pedro Henrique Alves Machado

Robson José Oliveira Júnior

Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB)

Homologado pela coordenação do
Curso de Ciências Biológicas em
____/____/____

Oswaldo Marçal Júnior

Uberlândia – MG

Novembro– 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Características genéticas e citogenéticas do melanoma murino B16-F10 e respostas *in vitro* frente ao tratamento com CuShydPhen nas linhagens TG180 e B16-F10

Pedro Henrique Alves Machado

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Robson José Oliveira Júnior

Uberlândia, de de 2016

“Toda pessoa possuidora de algum mérito tem consciência de que em seu interior existe uma força que não pára de incitá-la ao progresso infinito.”

Masaharu Taniguchi

Dedico este trabalho ao amor, se não fosse por ele não teria chegado até aqui.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao universo por ter me concedido a dádiva de existir e construir memórias, estas que são bens valiosos.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer minha família por todo o apoio prestado a mim, por fazer meus dias valerem pena, por ser um dos motivos para continuar buscando o progresso. A minha mãe, Andrea Silva Machado que me concedeu a vida, e, o primeiro contato com um sorriso, ao meu querido pai já falecido, aquele que me escolheu como seu filho, e, sempre teve fé em mim, Eber Roberto Guimarães.

Aos meus queridos irmãos com quem aprendi muitas coisas, assim como pude ensinar algumas, Josué Felipe Guimarães e Bethânia Cristina Guimarães.

Aos amigos que passaram por minha vida e aos que ainda continuam nela.

A minha querida companheira Vívian de Sá Vieira que não poupou energias para me ajudar de diversas formas e que acreditou em mim.

Ao meu querido amigo e orientador, Prof. Dr. Robson Oliveira Júnior, obrigado pelo aprendizado proporcionado, pela amizade e por ter acreditado em mim e nunca desistido. A Profa. Dra. Sandra Morelli, obrigado pelos ensinamentos, por ter me acolhido no laboratório, e ter me concedido a oportunidade de integrar essa grande família Citogen.

Aos meus queridos companheiros de laboratório, Sofia, Lorena, Tamiris, Suélen, Jéssica e Luísa, por terem me rendido muitos momentos de alegria, por me ajudarem nos experimentos e claro, pela amizade, a qual foi fundamental através de todos esses anos.

Agradeço aos membros dos laboratórios, os quais compartilharam seus ambientes de trabalho comigo, proporcionando a realização da minha pesquisa.

Ao coordenador do curso, Prof. Dr. Oswaldo Marçal Júnior.

A todo corpo docente do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, obrigado pelos ensinamentos acadêmicos e da vida, assim como agradeço pela vossa amizade.

Agradeço também a Universidade Federal de Uberlândia, em especial o Instituto Biologia assim como ao Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB), FAPEMIG, CNPq, CAPES, pelo financiamento e por me proporcionarem um ambiente de aprendizado.

Em suma agradeço a todos, sendo pessoas, animais, instituições que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento.

Agradeço aos membros da Banca, Dra.Sandra Morelli e Ma. Mariana A. P. Zoia, pela disponibilidade e por terem aceitado contribuir para a minha formação acadêmica.

LISTA DE ABREVIATURAS

B16-F10 – linhagem celular de melanoma metastático murino

Cisplatina – cis-diaminodicloroplatina (II)

CuShydPhen – Complexo de cobre (II) tiofeno 2-carbohidrazida 1,10 fenantrolina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

IC₅₀ – Concentração da droga requerida para reduzir 50% do crescimento celular em relação ao controle

INCA – Instituto Nacional de Câncer

KCl – Cloreto de potássio

NO – Óxido nítrico

NOR – Região Organizadora do Nucléolo

O₂⁻ - Ânion superóxido

Phen – 1,10 fenantrolina

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

rDNA – DNA ribossômico

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécie reativa de oxigênio

rRNA – RNA ribossômico

TG180 – Linhagem celular de sarcoma murino

Shyd – Tiofeno 2-carbohidrazida

TERT – Transcriptase reversa da telomerase

Resumo

A compreensão sobre a biologia tumoral é de essencial importância para o avanço de estratégias de prevenção e tratamento eficazes contra o câncer. Neste âmbito, o presente estudo caracterizou a linhagem de melanócitos murinos (B16-F10) usando técnicas de citogenética clássica e análises da expressão da telomerase por Real-Time PCR. Na linhagem B16F10 foi observada uma grande instabilidade cromossômica caracterizada por complementos cromossômicos próximos a tetraploidia, apresentando aneuploidia com número modal de 73 cromossomos e cromossomos marcadores resultantes de aberrações estruturais. Quanto à expressão da telomerase, a Real-Time PCR demonstrou que a linhagem expressa 2,95 vezes mais do que quando se comparado as hemácias murinas (consideradas células normais), que confere sucesso a esta linhagem para continuar seus ciclos infinitamente, imortalizando-as. Além da caracterização citogenética e expressão gênica, também foi analisado o efeito do complexo de cobre CuShydPhen sobre as linhagens B16-F10 e TG180 (linhagem celular de sarcoma murino). Foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vitro* com as B16-F10 utilizando o método de Alamar Blue. A dose capaz de reduzir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) em B16-F10 foi de $23\mu\text{M}$ e em TG180 foi de $40\mu\text{M}$. Os resultados obtidos indicaram uma alta citotoxicidade dose-dependente do complexo metálico, o tornando um promissor agente antineoplásico.

Palavras-chave: Câncer; Citogenética, linhagem murina tumoral; telomerase. Citotoxicidade; complexo metálico de cobre.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1- Breve caracterização citogenética e análise expressão da telomerase de B16-F10, linhagem de melanoma metastático murino..... | 1 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 2 |
| 2. OBEJETIVOS..... | 6 |
| 2.1 Objetivos gerais..... | 6 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 6 |
| 3. METODOLOGIA..... | 7 |
| 3.1 Manutenção <i>in vitro</i> da linhagem B16-F10..... | 7 |
| 3.2 Obtenção dos cromossomos mitóticos | 7 |
| 3.3 Bandeamento G e montagem do cariótipo..... | 8 |
| 3.4 Extração do RNA total e reação de transcrição reversa | 8 |
| 3.5 Avaliação de expressão da telomerase por PCR em tempo real (Real-Time PCR).... | 8 |
| 3.6 Análise estatística..... | 9 |
| 4. RESULTADOS..... | 9 |
| 4.1 Características tumorais da linhagem murina B16-F10..... | 9 |
| 4.2 Expressão da Telomerase na linhagem murina B16-F10..... | 14 |
| 5. DISCUSSÃO | 14 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 19 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 20 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 2 – Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i> do complexo de metálico CuShydPhen, frente células tumorais murinas..... | 23 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 24 |
| 2. OBJETIVOS..... | 28 |
| 2.1 Objetivos gerais..... | 28 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 28 |
| 3. Metodologia..... | 29 |
| 3.1 Manutenção <i>in vitro</i> das linhagens B16-F10 e TG180..... | 29 |
| 3.2 Avaliação da atividade citotóxica pelo método de Alamar blue..... | 29 |
| 4 RESULTADOS..... | 32 |
| 4.1 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> do complexo de cobre derivado de Tiofeno 2-carbohidrazida 1,10 fenantrolina (CuShydPhen) pelo ensaio de Alamar blue..... | 32 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 33 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 36 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 37 |

Capítulo 1

*Breve caracterização citogenética e análise expressão da telomerase de B16-F10,
linhagem de melanoma metastático murino.*

1. Introdução

As células são as unidades funcionais básicas do organismo humano, constituído todos os tecidos de nosso corpo. Toda célula eucariota possui em seu núcleo o ácido desoxirribonucléico (DNA), que é responsável por controlar suas funções vitais, e, para a manutenção dos tecidos, as células que os constituem precisam se replicar, podendo sofrer erros durante o processo replicativo. Tais erros são denominados mutações e acontecem de forma espontânea durante o tempo de sobrevivência das células, porém podem ser potencializadas por agentes externos (NUSSBAUM *et al.*, 2002; OJOPI & NETO, 2004). De acordo com o INCA (2011), por volta de 80% a 90% dos casos de câncer estão ligados a fatores ambientais, ou seja, extrínsecos.

No Brasil, baseado nas estimativas de 2016 e 2017, fornecidas pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), há previsão para ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, tendo em consideração casos de câncer de pele não melanoma.

O câncer mais incidente na população brasileira será de acordo com as estatísticas o de pele do tipo não melanoma, com 182 mil novos casos, subseqüentes pelos cânceres de próstata (61 mil), mama feminina (58 mil), colorretal (34 mil), pulmão (28 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (16 mil) (INCA, 2016).

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer resultante de uma desordem que afeta os melanócitos (células que são responsáveis por produzir melanina, pigmento que confere a cor da pele) e acomete predominantemente adultos de pele branca. Este tipo de câncer é o mais frequente no Brasil e corresponde a 30% da totalidade dos tumores malignos diagnosticados em nosso país e possui altas possibilidades de metástase (INCA, 2016).

Se detectado em estágio inicial atualmente há uma alta taxa de sobrevivência dos pacientes que possuem e sofrem com melanoma cutâneo. Existem estimativas para a ocorrência de 5.670 novos casos, destes 3.000 em homens e 2.670 em mulheres (INCA, 2016).

De acordo com o Sistema de Informação Sobre Mortalidade no ano de 2014 foi registrado 1.609 mortes decorrentes de melanoma cutâneo no Brasil (SIM, 2014).

Se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma, os casos novos de câncer caem para 420 mil. Em homens, os tipos mais frequentes de carcinomas serão o de próstata, pulmão, colorretal, estômago e cavidade oral; já nas mulheres, os de mama, colorretal, colo do útero, pulmão e estômago (INCA, 2016).

As mutações podem variar quanto ao seu tipo, podendo ser mutações pontuais, que ocorrem em apenas um nucleotídeo, ou, ser de um nível maior, gerando alterações em um cromossomo inteiro, bem como alterações do número de cópias dentro da célula e até mesmo na deleção de cromossomos por completo (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

O DNA é responsável por controlar todas as ações das células, assim como o processo de divisão celular, e quando danificado pode gerar disfunções neste controle do processo divisional da célula, levando a se multiplicar de forma descontrolada (INCA, 2006). O descontrole proliferativo é denominado neoplasia termo de origem grega que significa “novo crescimento”. Como resultado desta desordem as células perdem suas características genéticas originais, e, graças a sua alta capacidade proliferativa, as células neoplásicas podem dar origem a uma massa anômala denominada tumor (BOYLE & LEVIN, 2008). Os tumores podem ser classificados como benignos ou malignos, sendo que os malignos detêm a capacidade de metástase que se caracteriza pela habilidade de se desvencilhar desta massa tumoral inicial, podendo migrar pelo organismo e invadir diferentes tipos de tecidos além de poderem

adentrar em um vaso linfático ou sanguíneo, elevando assim sua capacidade disseminativa (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Câncer é um termo estabelecido para um conjunto de mais de 100 patologias que em comum possuem a proliferação descontrolada de células, e é usualmente associado aos tumores malignos os quais invadem tecidos e órgãos (INCA, 2014).

Todas as neoplasias possuem em comum a capacidade de se dividir indefinidamente, tal característica é ocasionada por mutações nos genes que gerenciam a proliferação celular (proto-oncogenes e genes supressores tumorais) desregulando-os. Assim a atividade da telomerase em células tumorais transita entre a superexpressão, dando a tais células telômeros funcionais e íntegros. Este fato não é observado na grande parte das células somáticas humanas, já que geralmente a expressão da telomerase e sua atividade são baixas ou até mesmo inexistentes (OJOPI & NETO, 2004; PERINI *et al.*, 2008; GRIFFITHS *et al.*, 2013).

Além disso, sabe-se que a inativação dos genes responsáveis pelos reparos no DNA corrobora para um aumento do nível de mutações no material gênico, podendo assim atingir genes importantes para a carcinogênese (OJOPI & NETO, 2004)

Devido a todo esse processo de desordem gênica, as células apresentam um polimorfismo quanto ao seu núcleo que pode variar de tamanho devido à quantidade de material genético contido no mesmo. Todo esse cenário também remete às instabilidades cromossômicas, devido aos rearranjos cromossômicos. O aumento do núcleo indica uma grande atividade gênica, que é uma das características tumorais (HANAHAN & WEINBERG, 2011)

Quando se fala em instabilidade cromossômica é fácil relacionar tal condição às alterações estruturais (rearranjos cromossômicos), que porventura acontecem durante a divisão celular, o que pode gerar quebras e junções de fragmentos de cromossomos,

estes acontecimentos normalmente originam alterações cromossômicas (ROCHA, 2013). A instabilidade cromossômica também pode culminar em alterações do número de moléculas de DNA, que estão estritamente relacionadas às mudanças numéricas de cromossomos e tais remanejamentos são as bases das mudanças genéticas que corroboram pra a oncogênese (GRIFFITHS, 2013). Um exemplo destas alterações numéricas é a poliploidia, e existem vários processos pelos quais uma célula pode se tornar poliplóide, estes estão categorizados em três classes: fusão celular, ciclo celular abortivo e endoreduplicação (MOSIENIAK & SIKORA, 2010).

A aneuploidia é definida como a presença do número anormal de cromossomos das células, sendo que nesse caso o número total não é múltiplo exato do conjunto haplóide da espécie. Essa diferenciação de cromossomos aneuplóides pode se dar apenas por um ou pelo número menor ou maior de cromossomos quando comparado com a célula selvagem (GRIFFITHS, 2013; ROCHA, 2013).

Grandes mudanças cromossômicas estão correlacionadas à carcinogênese e tais acontecimentos podem ser observados em células neoplásicas utilizando-se estudos citogenéticos (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2014).

Trabalhos pioneiros que visavam análises de alterações cromossômicas, já estavam correlacionados com os estudos dos tumores uma vez que grande parte continha às vezes dois tipos de alterações concomitantemente, tanto estruturais como numéricas (TUCKER & PRESTON, 1996). Colocado isto, há um vínculo entre o surgimento de células neoplásicas e mudanças nas composições estruturais cromossômicas, tornando possíveis análises citogenéticas. Sendo assim a citogenética é de suma importância tanto para investigações iniciais, como elucidação do processo de carcinogênese, quanto para pesquisas mais rebuscadas, como diagnóstico, prognóstico e escolha de tratamento tumoral (CASARTELLI, 1993).

A utilização de linhagens celulares advindas de modelos animais é essencial importância para a compreensão de variadas patologias que acometem os seres humanos. O processo de análises citogenéticas de uma linhagem tumoral possui diversas técnicas para que haja uma melhor percepção das mudanças recorrentes que a doença imprime nos cromossomos, um exemplo de técnica é a de bandeamento cromossômico (RANGARAJAN; WEINBERG, 2003).

O presente trabalho realizou a caracterização cariotípica da linhagem de melanoma metastático murino (B16-F10), utilizando as técnicas de coloração com Giemsa e bandeamento cromossômico, bem como analisou a expressão da telomerase por Real-Time PCR. Tais caracterizações são de suma importância para evidenciar o papel das anomalias cromossômicas no processo de imortalização celular.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais:

Realizar breve caracterização citogenética da linhagem celular B16F-10 e quantificar o nível de expressão da telomerase desta linhagem.

2.2. Objetivos específicos:

- Realizar contagem e classificação morfológica dos conjuntos cromossômicos;
- Elaborar o cariótipo da linhagem utilizando a técnica de coloração com Giemsa e banda G;
- Comparar a expressão da telomerase por PCR em tempo real da linhagem B16-F10 com células não-tumorais (sangue total).

3. Metodologia

3.1. Manutenção *in vitro* da linhagem B16-F10

A linhagem foi mantida *in vitro* em meio RPMI-1640 (Gibco, Pasley, UK) suplementado com HEPES, L-glutamina, penicilina, estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), soro fetal bovino inativado por aquecimento (Cultilab, 40, Campinas, Brazil) e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.2. Obtenção dos cromossomos mitóticos

A obtenção dos cromossomos mitóticos foi feita através da adição, *in vitro*, de colchicina a 0,0125% na proporção de 0,5 mL para 15 mL de meio. Posteriormente as células foram removidas da garrafa, centrifugadas e hipotonizadas em cloreto de potássio (KCl) a 0,075M. A suspensão celular foi então mantida em estufa a 37°C por 30 minutos e posteriormente foi centrifugada e ressuspensa em 3 ciclos de fixação em fixador Carnoy, que foi preparado na proporção de 3:1 (metanol: ácido acético). A suspensão celular obtida foi armazenada a -20°C em 1,5 mL de fixador, no freezer. As lâminas para análise dos cromossomos em microscópio óptico foram lavadas, secas ao ar e imersas em água a 63°C. Após 5 minutos as lâminas foram retiradas da água quente mantendo uma pequena camada aquosa em sua superfície para que a suspensão de células fosse gotejada em diferentes regiões da lâmina.

Para análise das metáfases as lâminas foram coradas com Giemsa a 0,05% na proporção de 0,5 mL para 9,5 mL de tampão fosfato (PBS). As metáfases de melhor visualização foram fotografadas e escolhidas para a montagem do cariótipo final com o objetivo de ressaltar a posição do centrômero, número e tamanho dos cromossomos.

Para a identificação dos cromossomos, foi utilizado o software MicroMeasure, o qual os caracterizam de acordo com o critério da razão entre os braços cromossômicos.

3.3 Bandeamento G e montagem do cariótipo

Para facilitar e confirmar a montagem cariotípica foi realizada a técnica de banda G. Para essa técnica, as lâminas contendo os cromossomos mitóticos foram mergulhadas em uma cubeta contendo solução de tripsina a 0,05% durante alguns segundos e posteriormente lavadas com PBS para então serem coradas com Giemsa e analisadas em microscópio.

3.4. Extração do RNA total e reação da transcrição reversa

As células foram trituradas em um homogeneizador e o RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Inc.). A reação de transcrição reversa foi realizada com 1µg de RNA total das amostras completada para um volume final de 20 µL com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), contendo 10 unidades de inibidor de RNase, 40 unidades de transcriptase reversa MMLV, 1x MMLV-RT buffer, 200 µM de cada dNTP e 6 µM de primers hexâmeros randômicos. A reação foi incubada em um termociclador a 37°C por 1 hora, produzindo assim os cDNAs.

3.5. Avaliação de expressão da telomerase por PCR em tempo real (Real-Time PCR)

O cDNA foi amplificado por Real-Time PCR (qPCR) utilizando os seguintes *primers* para o gene da telomerase: senso 5'-GGATTGCCACTGGCTCCG-3'; anti-

senso 5'- TGCCTGACCTCCTCTTGTGAC-3'. O gene constitutivo da actina foi utilizado como controle positivo interno para normalizar os produtos das reações de amplificação. Para a reação de PCR desse gene foram utilizados os seguintes *primers*: sentido 5'GCACCACACCTTCTACAATG-3' e antisenso 5' - GTGGTGGTGAAGCTGTAG - 3'. Para as reações de amplificação 2 µL de cDNA foram adicionados a 20 µL de reação de PCR total, contendo 200 µM de cada dNTP, 10 µM de primer, 2.0 mM de MgCl₂ para as reações da actina e 1.5 mM de MgCl₂ para as reações da telomerase, 1.5 unidades de Taq DNA polimerase e tampão 1x. Para a revelação fluorescente do produto amplificado foi utilizado o agente SyberGreen I.

3.6. Análise estatística

As análises estatísticas referentes à distribuição cromossômica foram realizadas utilizando intervalo de confiança para proporções pelo teste t-student. Todos os dados foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism versão 6.0 e as comparações entre os grupos de dados foram realizadas por teste ANOVA seguido por Bonferroni. Por fim, foram plotados gráficos expressos como média ± erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1 Características tumorais da linhagem murina B16-F10

Para os estudos da linhagem murina B16-F10, foram analisadas 100 metáfases com intuito de contar e classificar os cromossomos, tais metáfases foram fotografadas para as análises. A linhagem celular apresentava claramente a presença de núcleos com tamanhos variados (Figura 1), o que condiz às características poliploides que foram observadas.

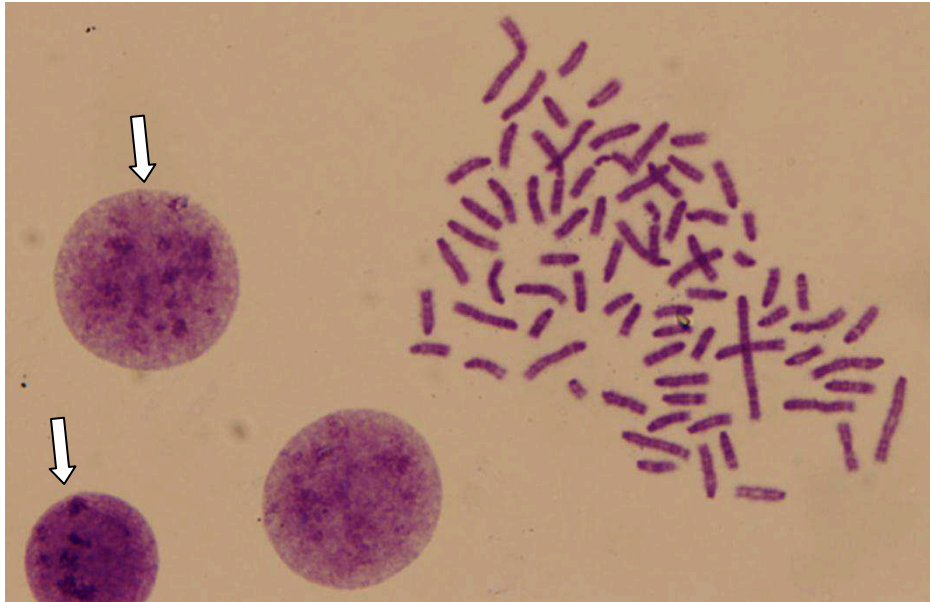


Figura 1- Figura evidenciando a variação no tamanho dos núcleos das células de B16-F10 (indicado pelas setas), este aumento do volume do núcleo é condizente com suas características poliplóides.

Analisando as metáfases da linhagem celular B16-F10, foi observado que estas apresentaram uma variação de 50 a 99 cromossomos em sua constituição, sendo que 81,3% delas se encontraram próximas ao estado de tetraploidia (variando entre 68 e 75 cromossomos), as metáfases tiveram como número modal 73 cromossomos (Figura 2).

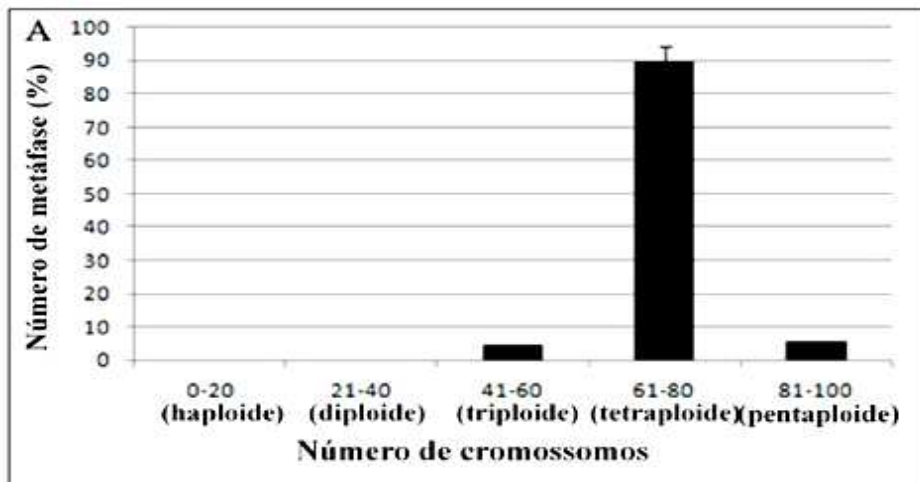


Figura 2- Gráfico representativo da distribuição cromossômica de B16-F10.

Muitas aberrações cromossômicas estruturais foram encontradas durante a caracterização citogenética. Foram observadas metáfases que possuíam cromossomos metacêntricos (Figura 3) e submetacêntricos (Figura 4), resultantes de Translocações Robertsonianas, que são indicados pelas setas vermelhas (Figura 5).

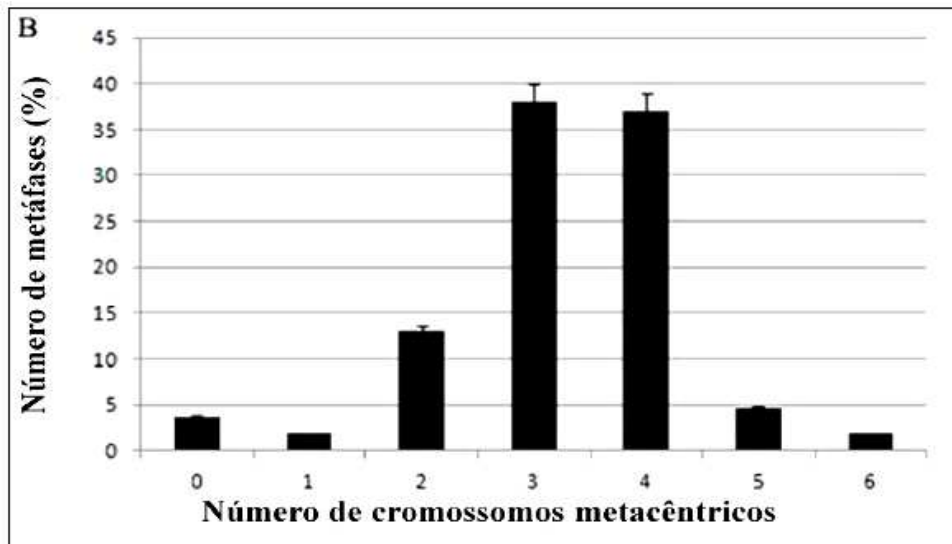


Figura 3- Gráfico representando a frequência do número de cromossomos metacêntricos por metafase.

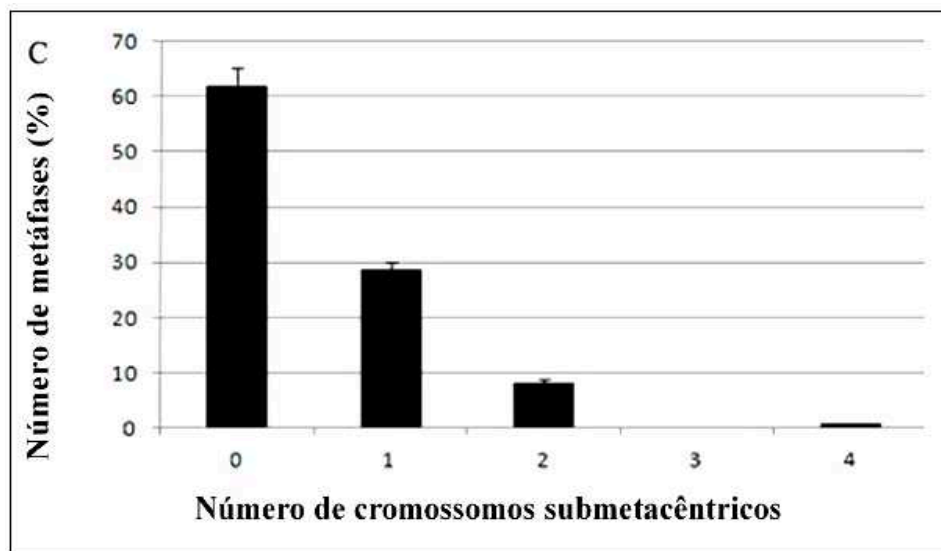


Figura 4- Gráfico representando a frequência do número de cromossomos submetacêntricos por metafase.



Figura 5 Cromossomos de B16-F10 marcadores indicados pelas setas vermelhas.

Também foi observada a presença de longos cromossomos acrocêntricos nas metáfases (Figura 6 e Figura 7), cujo os padrões de bandas evidenciadas pelo processo de Banda G (Figura 8), indicam que tais cromossomos são resultantes de translocações repetitivas em *tandem*, que normalmente envolve dois cromossomos ligados uns aos outros em regiões teloméricas.

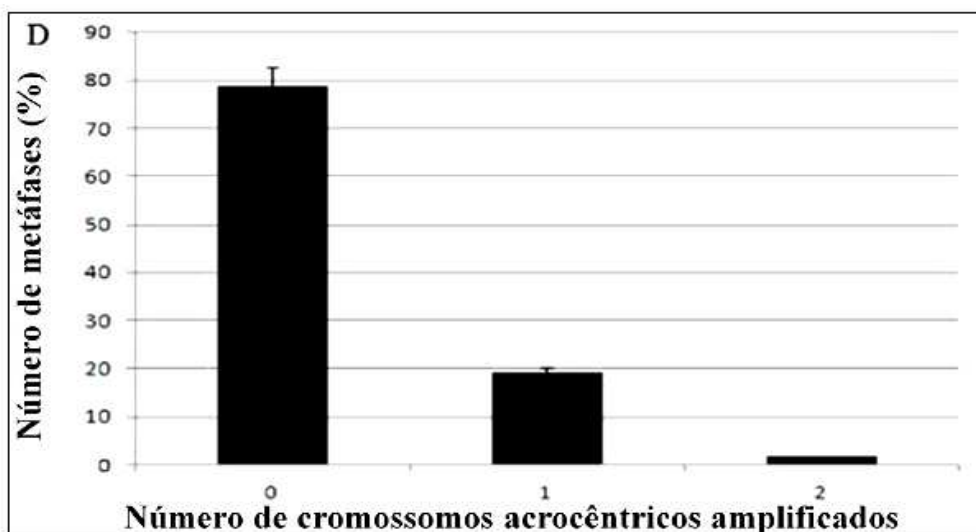


Figura 6- Gráfico representando a frequência do número de cromossomos acrocêntricos amplificados por metáfase

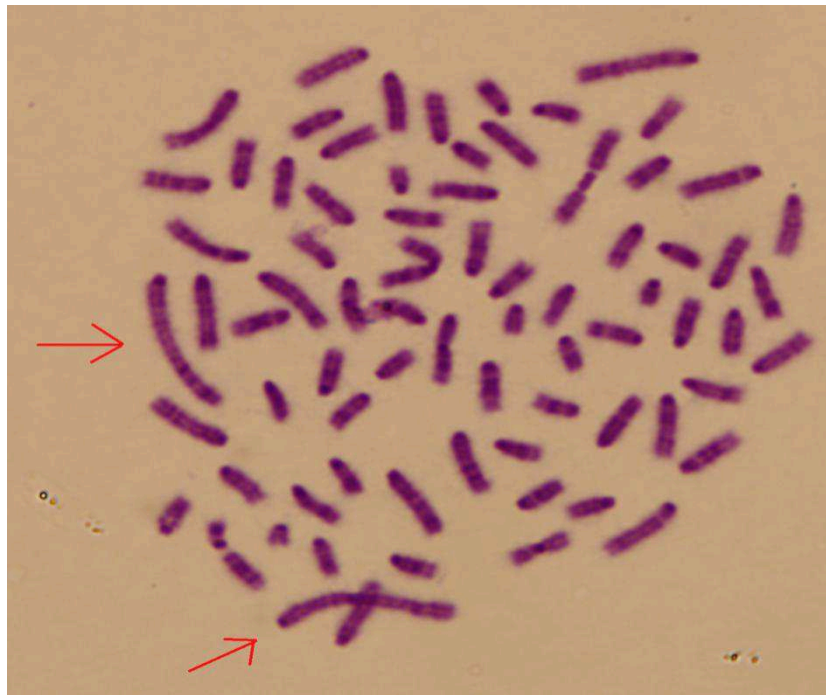


Figura 7- Longos cromossomos acrocêntricos encontrados na linhagem B16-F10 indicados pelas setas vermelhas.

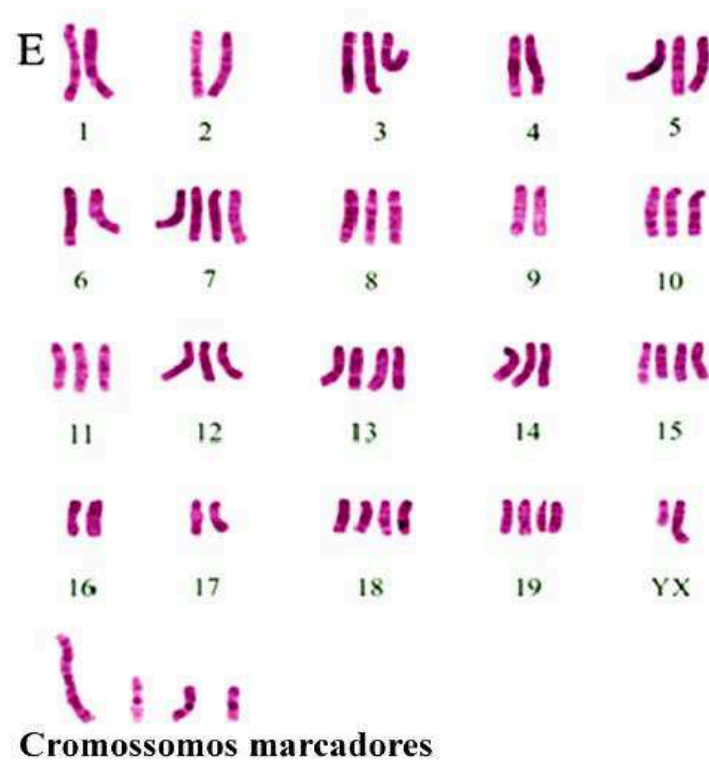


Figura 8- Cariótipo de B16F10 utilizando a técnica de Bada-G que mostra a presença da tetrassomia em alguns cromossomos, indicando a origem tetraplóide desta linhagem celular.

4.2 Expressão da Telomerase na linhagem murina B16-F10

A análise da expressão da telomerase foi realizada em comparação com células do sangue total murino. Após a realização da análise foi observado que a linhagem B16-F10 apresentou um nível de expressão da telomerase mais elevado (2,95 vezes superior) em relação às células sanguíneas (Figura 9).

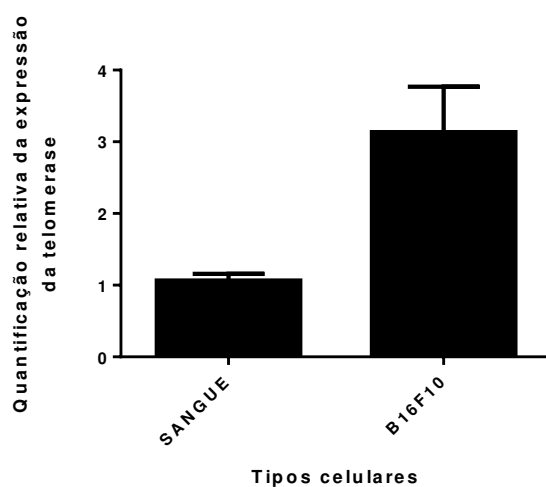


Figura 9- Análise quantitativa por qPCR da expressão do gene da telomerase. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Foi utilizado o teste t-student e valores de $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. Discussão

Caracterizações citogenéticas são de suma importância para se compreender a função, estrutura e comportamentos tanto biológicos quanto patológicos dos cromossomos. Tal estudo se vale de técnicas que são capazes de analisar os cromossomos metafásicos de uma célula em divisão. Por facilitar na identificação das alterações cromossômicas e ajudar na decisão de qual método terapêutico mais adequado seguir, a citogenética se faz muito importante no melhor entendimento do câncer (CHAUFFAILLE, 2005).

Baseado na cariotipagem da linhagem B16-F10 pode-se constatar variadas características tumorais, sendo a grande maioria delas correlacionadas à instabilidade cromossômica (estruturais e numéricas), fato melhor observado com a utilização da técnica de bandeamento G, que propicia melhor detecção de tais alterações (CASTRO, 2014).

Graças a estudos realizados sabe-se que o quadro de instabilidade cromossômica é uma das principais características observadas em células tumorais, e que tal desenvolvimento corrobora para a formação de células malignas (HANAHAN & WINBERG, 2011).

O sucesso da evolução tumoral está vinculado ao acúmulo de uma série de mutações genéticas, que são de suma importância para a obtenção dos mecanismos favoráveis para o seu crescimento (CASTRO, 2014). O microambiente favorável que as células malignas acarretam no local onde se situam acaba por gerar uma vantagem seletiva para as mesmas e tal sucesso pode ser explicado pela sua enorme variabilidade cariotípica (ROCHA, 2013). Tal variabilidade instituída pela instabilidade cromossômica é responsável por gerar uma população de células com grandes diferenças quando se leva em consideração o seu conteúdo genético, o que pode favorecer ou desfavorecer a proliferação das células, quanto levado em consideração as condições do hospedeiro em que as células malignas se encontram. Devido a tal diferença entre as células de uma mesma linhagem tumoral pode explicar, por exemplo, a dificuldade de se destruí-las a partir das técnicas terapêuticas disponíveis (DUESBERG *et al*, 2007).

As células somáticas normais em *Mus musculus* naturalmente apresentam vinte pares de cromossomos acrocêntricos (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2014), quadro muito diferente do que foi constatado após a caracterização da linhagem B16-F10, pois 81,3%

das metáfases analisadas apresentaram hipertriploidia quase alcançando a tetraploidia (variação de 68 a 75 cromossomos), com número modal de 73 cromossomos.

No presente trabalho foram encontradas tanto aberrações numéricas como aneuploidias assim como aberrações estruturais como translocações Robertsonianas.

A existência de aneuploidias (alterações numéricas) é um mecanismo fisiológico encontrado pela célula maligna para o sucesso de sua perpetuação, pois várias cópias de um cromossomo implicam em várias réplicas de genes e uma superexpressão gênica final anormal, sendo essencial para a tumorigênese, pois cada cromossomo perdido ou adquirido detêm milhares de genes que podem alterar o funcionamento correto das células, podendo culminar em células neoplásicas (FANG & ZHANG, 2011; CASTRO, 2014).

Quanto à morfologia cromossômica, foram encontrados tipos morfológicos que não são acrocêntricos, tais como metacêntricos, submetacêntricos, e cromossomos acrocêntricos amplificados, resultantes das translocações Robertsonianas. As translocações Robertsonianas são resultado de um processo de perda dos braços curtos de cromossomos acrocêntricos na região do centrômero e a posterior fusão dos seus braços longos pelo centrômero (EDELHANN; PANDITA; MORROW, 1999; SHAFFER; LUPSKI, 2000; CELEP, 2006).

Vários estudos evidenciam a importância destas translocações e sua ação na progressão do câncer, este processo está relacionado graças às formações de genes quiméricos que possuem diferentes papéis na proliferação celular e que alteram a expressão de genes envolvidos no controle deste mecanismo (BARR, 1998).

As anomalias estruturais são denominadas Cromossomos Marcadores, que são observados em diferentes linhagens tumorais. Possivelmente os cromossomos

marcadores atribuem vantagens á célula tumoral para o seu desenvolvimento, pois tais são selecionados positivamente sempre (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2014).

Outro fato que pode ser observado é que existem diferenças entre os volumes dos núcleos da linhagem tumoral, e, que quando comparado a células normais, o tamanho do núcleo das células neoplásicas se destaca por ser muito maior do que as de células não tumorais (SNUSTAD & SIMMONS, 2010).

O evidente aumento da quantidade de material genético pode ser uma das explicações plausíveis para essas polimorfias nucléicas, o crescimento genômico é uma das características fisiológicas acarretadas pela poliploidia. Em células poliploides comumente se encontra uma super-dosagem gênica, que por sua vez culmina em uma elevação da síntese protéica (OTTO, 2007; STORCHOVA & PELLMAN, 2004). A poliploidia possui a capacidade de impulsionar e amplificar o fenótipo neoplásico (ROCHA, 2013).

Com utilização da técnica de banda G foi possível fazer-se a montagem e análise do cariótipo da linhagem de B16F-10. O padrão de bandas observado sugere que a células passaram por processos de translocações Robertsonianas, originando os cromossomos marcadores metacêntricos e subetacêntricos, assim como translocações que envolvem a fusão telomérica que originaram os alongados cromossomos acrocêntricos.

Outra estratégia das células malignas é a de se dividir indefinidamente, ou seja, sem atingir o seu limite divisional (Limite de Hayflick), ou seja, não chegam ao ponto crítico que delimita a inviabilidade celular de se dividir e o início do processo de senescência (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Esta façanha acontece por que há a reativação e elevação do nível de expressão do gene que transcreve a enzima telomerase que volta a reparar os telômeros, impedindo assim que eles se encurtem. (CASTRO, 2012).

A superexpressão da telomerase permite que as células tumorais elevem o seu potencial carcinogênico, tendo em vista que estudos apontam que existe correlação entre a reativação da telomerase com evolução do tumor para formação de metástases (CHANG *et al.*, 2005).

A análise da expressão da telomerase por qPCR indicou que houve um aumento de 2,95 vezes na expressão da telomerase na linhagem B16-F10 em comparação com células sanguíneas de camundongo, resultado esperado uma vez que a linhagem é linhagem tumoral, portanto imortalizada, possuindo assim todas as características e mecanismos favoráveis para as divisões infinitas tal fato não observado em eritrócitos que são células normais, que possuem expressão da telomerase baixa ou mesmo ausente como na maioria dos tecidos murinos. Estudos apontaram que não foi avistada atividade da telomerase em tecidos murinos extraídos do músculo cardíaco, músculos estriados esqueléticos, cérebro, estômago e pele, porém apresentaram níveis de expressão da telomerase em alguns outros tecidos como, por exemplo, fígado, testículos e ovários (FORSYTH *et al.*, 2002).

As perspectivas futuras para o presente trabalho estão relacionadas com a realização de técnicas para melhor caracterização cariotípica, sendo elas: NOR, bandeamento C, coloração com cromomicina A3, coloração com fluorocromo Hoechst e o bandeamento por endonucleases de restrição, como por exemplo, as enzimas *Apa* I, *BamH* I, *Dde* I, *EcoR* I e *Hind* III e o FISH.

6. Conclusão

Levando em consideração os resultados obtidos e apresentados no presente trabalho, foi possível notar a importância dos eventos mutacionais e de rearranjos cromossômicos que corroboraram para que a linhagem evoluísse para células tumorais, fato evidenciado pela enorme instabilidade gênica das células B16-F10 e capacidade de se dividir infinitamente.

A análise citogenética da linhagem B16-F10 possibilitou inferir que tal linhagem possui uma população celular diversa quando se compara as características cromossômicas, demonstrando número modal de 73 cromossomos, se aproximando da tetraploidia. A análise da expressão da telomerase evidenciou um aumento em sua expressão, o que confere um elevado potencial carcinogênico. Em suma, os resultados obtidos auxiliaram na caracterização da linhagem B16-F10 e na elucidação do processo de evolução cariotípica desta linhagem celular que é amplamente utilizada em pesquisas oncológicas.

7. Referências

ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L. C. B., MONTANARI, C. A., DONICCI, C. L., LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, Vol. 28, No 1, 2005, p. 118-129.

BARR, F. G. Translocations, cancer and the puzzle of specificity. **Nature Genetics**. v. 19, p. 121-124, 1998.

BOYLE, P., LEVIN, B.. **World cancer report 2008**. Lyon: França: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. 2008.

CASARTELLI, C. Cancer and cytogenetics. **Revista Brasileira de Genética**, v.4, p. 1109-1131, 1993.

CASTRO, J. P. L. **Caracterização citogenética e análise da expressão dos genes *Mycn* e *ErbB2* da linha celular tumoral de *Rattus norvegicus*, CLS-ACI-1**. Vila Real, 2012. 225f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Dourado, 2012.

CELEP, F; KARAGUZEL, A; OZEREN, M; BOZKAYA, H. Chromosomal abnormalities in 457 Turkish patients with MCA/MR. **Turk J Pediatr**. v. 48, p. 130-4, 2006.

CHANG, M.W.F.; GRILLARI, J.; MAYRHOFER, C.; FORTSCHEGGER, K.; ALLMAIER, G.; MARZBAN, G.; KATINGER, H.; VOGLAUER, R. Comparison of early passage, senescent and hTERT immortalized endothelial cells. **Experimental Cell Research**, v.309, p.121-136, 2005.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Citogenética e biologia molecular em leucemia linfocítica crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 27(4): 247-252, 2005.

DUESBERG, P., LI, R., SACHS, R. Fabarius A, Upender MB, Hehlmann R: **Cancer drug resistance: The central role of the karyotype**. Drug Resistance Updates 2007, 10: 51–58.

EDELMANN, L; PANDITA, R. K; MORROW, B. E. Low-copy repeats mediate the comom 3 Mb deletions in patients with velocardio-facial syndrome. **Am J Hum Genet**. v. 64, p. 1076-1086, 1999.

FANG, X., ZHANG, P. Aneuploidy and tumorigenesis. Elsevier: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 22: 595-601, 2011.

FORSYTH, N. R., WRIGHT, W. E., SHAY, J. W. Telomerase and differentiation in multicelular organismo: Turn it off, turn it on, and turn it off again. **Differentiation**, 69:188-197, 2002.

GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S. R., LEWONTIN, R. C., CARROL, S. B. **Introdução à Genética**. 10ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2013, p. 220-240.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **A situação do câncer no Brasil**. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2006, 120p.

_____. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p

_____. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2016. 124p.

_____. **Atlas on-line de mortalidade**, 2016. [Internet] Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo10/consultar.xhtml#panelResultado>>. Acesso em novembro de 2016.

MOSIENIAK, G., SIKORA, E. Polyploidy: The link between senescence and cancer. **Current Pharmaceutical Design**. 16: 734-740, 2010.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002, p. 5-24.

OJOPI, E. P. B., NETO, E. D. Genômica e oncologia. In: Genômica. São Paulo: **Atheneu**, 2004, p. 363-387.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R. J., GOULART FILHO, L. R., BASTOS, L. M., ALVES, D. D., SANTOS E SILVA, S. V. MORELLI, S. Contributions of cytogenetics to cancer research. **Bioscience Journal**. v. 30, n 1, p. 245-259, 2014.

OTTO, S. P. The evolutionary consequences of polyploid. Elsevier: **Cell**. Ed. 131, novembro, p. 452-62, 2007.

PERINI, S., SILLA, L. M. R., ANDRADE, F. M. A telomerase em células-tronco hematopoéticas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 30 (1): 47-53, 2008.

PERINI, S., SILLA, L. M. R., ANDRADE, F. M. A telomerase em células-tronco hematopoéticas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 30 (1): 47-53, 2008.

ROCHA, C. A. M. **As pernas do caranguejo**. 1ª Edição. Belém, 97p., 2013.

SCUDELER, P. E.S. **Estudo da estrutura molecular dos cromossomos supranumários em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characiformes, Characidae)**. Botucatu, 2010. 136f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia). Universidade Estadual Paulista- UNESP, 2010.

SHAFFER, L.G; LUPSKI, J. R. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. **Annu Rev Genet**. v. 34, p. 297- 329, 2000.

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 4ª Edição, 2010.

STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. **Molecular cell biology**, v.5, p.45-54, 2004.

TUCKER, J. D., PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research**: Elsevier, 365: 147- 159, 1996.

Capítulo 2

*Avaliação do potencial citotóxico in vitro do complexo de metálico CuShydPhen, frente
células tumorais murinas B16-F10 (melanoma) e TG180 (sarcoma)*

1. Introdução

O câncer é uma doença que possui alta incidência, além de ser uma enfermidade que leva muitas pessoas a óbito, sendo considerado um problema de saúde pública da atualidade. São denominadas câncer mais de cem doenças que possuem como características a desordem do crescimento e divisão celular, e habilidade de invasão de órgãos próximos do sítio da doença assim como aqueles que estão mais distantes (THULLER, 2011).

Para tratamento do câncer existem vários métodos terapêuticos, porém os mais utilizados são três: cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A utilização destas técnicas pode ser combinada para aperfeiçoar o tratamento das neoplasias, elevando assim as chances do aumento do tempo de sobrevivência do paciente, contenção do avanço das células malignas, abrandamento dos sintomas acarretados pelo processo tumoral e como objetivo mais desejado a erradicação da doença (GADELHA *et al.*, 2014; LORENCETTI & SIMONETTI, 2005).

São raros os casos em que é utilizada apenas uma técnica terapêutica, para a escolha das estratégias de tratamento tumoral algo que é levado em consideração é a sua vulnerabilidade as técnicas terapêuticas (THULLER, 2011). Fora isto, algo que deve ser avaliado é a magnitude do tumor primário e se há ou não metástase do mesmo, para se definir qual (ou quais) técnica será adotada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014 b). Algo que faz uma grande diferença na eficácia do tratamento contra o câncer é a sua identificação prematura e iniciação imediata do tratamento elevando os números de cura para um terço dos casos, como por exemplo, os cânceres de colo do útero, mama, cólon e cavidade oral (THULLER, 2011).

A técnica cirúrgica é considerada como atenuadora ou curativa e visa à retirada da massa tumoral, sendo indicada para quadros iniciais que não demonstram metástase (LORENCETTI & SIMONETTI, 2005).

A radioterapia se caracteriza pelo o uso de ondas de radiação que impactam o núcleo celular, lesionam o DNA e acarretam a deterioração de genes que controlam o crescimento e desenvolvimento celular, resultando na morte das células (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014b).

De acordo com Thuler (2011), a quimioterapia se utiliza de compostos químicos (antineoplásicos ou “quimioterápicos”) aplicados em intervalos de tempo regulares, que pode variar dependendo da estratégia terapêutica. O resultado do tratamento por estes compostos químicos é a indução de morte celular ou desaceleração do ritmo divisional das células malignas, devido às capacidades que os antineoplásicos detêm (MALONE & LINDSAY, 2006; NATIONAL INSTITUTE OF CANCER, 2007b).

Os quimioterápicos podem ter diversas composições e mecanismos de ação e dentre eles existem os complexos metálicos. Um prógono da utilização dos complexos metálicos na terapia contra o câncer foi o cisdiaminodicloroplatina (II), usualmente chamado de “cisplatina”. Tal complexo foi muito utilizado nas ultimas décadas, porém com o uso deste antineoplásico no tratamento do câncer pode-se observar vários efeitos colaterais acarretados pela sua administração, assim como o desenvolvimento de resistência celular, fazendo-se necessárias assim pesquisas com novos complexos metálicos (FONTES *et al.*, 2005).

Quando analisado alguns dos efeitos colaterais da cisplatina, pode-se concluir que eles se dão em virtude da interação do composto com peptídeos e proteínas celulares (MEDEIROS, 2011). Algo não desejado é também a resistência adquirida ao

medicamento que acontece graças à união da cisplatina com a glutonina, a formação de tal complexo reduz a concentração intracelular do composto, reduzindo assim a quantidade de moléculas disponíveis para interagir com os alvos corretos. Quanto aos efeitos indesejáveis, o composto metálico cisplatina acarreta na nefrotoxicidade, afetando negativamente a capacidade de filtração renal, efeito que pode ser devido à interação da cisplatina com moléculas sulfuradas presentes no organismo humano, possivelmente culminando no grande acúmulo de tais compostos (MEDEIROS, 2011; SILVA, 2012).

Devido a estas limitações encontradas perante a utilização da cisplatina, pesquisas foram realizadas para se desenvolver novos complexos metálicos que fossem mais vantajosos em relação ao já costumeiramente utilizado. Assim, a aplicação dos complexos metálicos com cobre (II) no tratamento contra o câncer tem-se apresentado eficaz, fato é que salientado pelo seu potencial citotóxico, o que é resultado de sua alta capacidade de sensibilização celular. Outros fatos interessantes sobre o cobre (II) são a sua alta solubilidade em solventes comuns, enorme disponibilidade e seu baixo custo, o que torna o composto bem vantajoso (SILVA *et al.*, 2011).

Algo que tem se mostrado importante é a complexação do cobre (II) com outras substâncias para aumentar o seu potencial terapêutico, sendo assim, recentemente pesquisadores sintetizaram um novo complexo de cobre, que consiste na junção da fenantrolina e hidrazida, sendo denominado de tiofeno 2-carbohidrazida 1,10-fenantrolina e genericamente chamado de “CuShydPhen”.

A 1,10-fenantrolina age como elemento doador e quando em associação com o cobre acarreta no seguinte composto $[Cu(1,10-Phen)_2]^+$ como exemplificado na figura 1, detêm satisfatória atividade nucleofílica, sendo que sua interação com o DNA se dá em maior parte pelo sulco maior, onde um ROS (espécie reativa de oxigênio) é gerado

graças a união das cadeias por um mecanismo oxidativo, agente responsável pelos danos na molécula de ácido desoxirribonucléico (POLICARPI, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

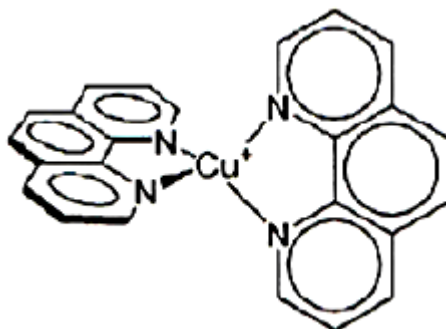


Figura 1- Representação da estrutura do complexo $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$

O cobre é um micronutriente essencial para os organismos vivos, pois realiza uma grande gama de funções nos organismos vivos, como exemplo os processos oxidativos e transferência de elétrons. Por realizar tais funções nos organismos, o cobre está presente naturalmente neles, como outros metais de transição. Graças à facilidade de sofrer redução (Cu (I) para Cu (II)) o cobre participa de várias reações moleculares que envolvem óxido-redução, interagindo assim com as moléculas de oxigênio resultando em espécies reativas de oxigênio (ROS) (TISATO *et al.*,2010).

Ensaio *in vitro* com linhagens tumorais revelaram que tais células apresentaram grande absorção de cobre, e que o metal desempenhou atividade citotóxica assim como capacidade genotóxica, fragmentando o DNA. Essas propriedades estão correlacionadas com a concentração intracelular de cobre e com o número de interações entre cobre e DNA gerados dentro das células (SILVA *et al.*, 2011).

Os experimentos de citotoxicidade *in vitro* são utilizados pra testar a confiabilidade biológica de potenciais antineoplásicos, ou seja, resultam em

informações sobre como tais compostos podem ser utilizados em concentrações em que há a máxima eficácia de seu efeito citotóxico de modo seguro, ou apontar também os danos celulares infringidos pela substância avaliada (COSTA *et al.*, 2008).

O complexo ternário de Cu (II) com tiofeno 2-cabohidrazida e 1,10-fenatrolina genericamente denominado “CuShydPhen” é exemplo de um promissor complexo antitumoral baseado em cobre, segundo Pereira-Maia (2011). Neste contexto o presente trabalho averiguou o potencial citotóxico *in vitro* do composto “CuShydPhen”, valendo-se de linhagens celulares melanoma B16F-10 e sarcoma 180 (TG180).

Estudos sobre novos complexos são de suma importância uma vez que o câncer se trata de um problema de saúde pública. Pesquisas nesta área possuem elevada contribuição social, podendo ajudar no aumento da expectativa de vida populacional. A incidência do câncer tem aumentado devido a vários fatores, além do que os novos tumores tem se mostrado uma resistência progressiva a quimioterápicos, tornando-se imprescindível o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade citotóxica (*in vitro*) do complexo metálico derivado do cobre II (“CuShydPhen”).

2.2 Objetivos específicos

- Testar a atividade citotóxica *in vitro* do “CuShydPhen” utilizando as linhagens celulares melanoma B16-F10 e sarcoma (TG180), por meio do ensaio de citotoxicidade Alamar blue.

- Determinar a Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular (IC50) *in vitro* do “CuShydPhen”;

3. Metodologia

As análises de citotoxicidade foram realizadas pelo teste Alamar Blue. As Linhagens celulares utilizadas foram B16-F10 e sarcoma 180. O complexo em estudo (“CuShydPhen”) foi fornecido pela Professora Doutora Françoise Vasconcelos Botelho, do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI) da Universidade Federal de Uberlândia, a qual tem parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) que produziu e forneceu o complexo para a mesma.

3.1 Manutenção das linhagens celulares B16-F10 e TG180

As linhagens celulares foram mantidas *in vitro*, cultivadas em frascos de 25 cm² em meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK), suplementado com 25 mM HEPES, 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 10% de soro fetal bovino inativado por aquecimento (Cultilab, Campinas, Brazil) e foram mantidas em uma estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.2 Avaliação de atividade citotóxica pelo método Alamar Blue

O Alamar Blue (Resazurina) é um composto capaz de indicar, por uma reação de óxido-redução, a presença de células viáveis, ocorrendo à passagem de coloração azul não-fluorescente (resazurina) para rosa altamente fluorescente (resorufina). O mecanismo pelo qual este processo de redução ocorre ainda não está bem esclarecido, o

qual pode ocorrer por reações enzimáticas ou químicas em células viáveis (HIGUCHI, 2007).

Para a realização do ensaio de viabilidade celular utilizando Alamar blue as linhagens celulares (1×10^5 cels/mL) foram incubadas em 200 μ L de meio de cultura RPMI-1640 completo em uma microplaca estéril de 96 poços. Os complexos de cobre foram diluídos de forma seriada de 1:2, o qual variou de 10^{-4} a $6,10 \times 10^{-9} \mu$ M. A microplaca foi incubada a 37°C com 5% de CO₂, por 24 horas. Na sequência, foram adicionados em cada poço da microplaca 15 μ L do agente revelador Alamar Blue 1:1, procedendo à leitura após 6 horas de incubação. Os experimentos foram realizados em triplicata. A leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro a 570 e 600 nm (HIGUCHI, 2007).

A viabilidade celular foi calculada utilizando-se as densidades ópticas (DO) dos poços das monocamadas tratadas, comparadas com a DO média dos poços controles (células incubadas na ausência de tratamento) utilizando fórmula F1.

$$V(\%)(O2 \times At1) - (O1 \times At2)(O2 \times P1) - (O1 \times P2) \times 100\% \quad (\mathbf{F1})$$

Onde:

V (%) = Viabilidade celular em porcentagem

O1 = 117216 (valor pré-determinado do coeficiente de desaparecimento molar do Alamar blue oxidado a 570nm)

At1 = Densidade óptica dos poços com células tratadas a 570nm (incubadas com CuShydPhen) menos o valor da densidade óptica da média do branco;

O2 = 80586 (valor pré-determinado do coeficiente de desaparecimento molar do Alamar blue oxidado a 600nm)

At2 = Densidade óptica dos poços com células tratadas a 600nm (incubadas com CuShydPhen) menos o valor da densidade óptica da média do branco;

Abco = Densidade óptica média do branco

P1 = Densidade óptica da média do controle negativo a 570nm

P2= Densidade óptica da média do controle negativo a 600nm

A IC₅₀ (concentração que inibe 50 % do crescimento celular em relação ao controle) foi determinada a partir de uma regressão não linear (GraphPad Prism), onde foi relacionado o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas, com intervalo de confiança de 95% (p<0,05). Logo após foi realizado o teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

A placa de tratamento teve a disposição dos volumes realizada da seguinte forma: o branco possuía 100µL de meio RPMI incompleto e 100µL de meio RPMI completo a 2%; o controle negativo continha 100µL de meio RPMI incompleto e 100µL de células; o controle positivo possuía 100µL do medicamento já usado em quimioterapias, 5-fluorouracil (na concentração de 0,1µM), mais 100µL de células; e os demais poços (poços contendo os compostos a serem testados) possuíam 100µL de células adicionados de 100µl da concentração adequada do complexo devidamente diluído (Figura 2).

| | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| CSP 5x10 ⁻⁵ | CSP 2,5x10 ⁻⁵ | CSP 10 ⁻⁵ | CSP 5x10 ⁻⁶ | CSP 2,5x10 ⁻⁶ | CSP 1,25x10 ⁻⁶ | CSP 10 ⁻⁶ | CSP 5x10 ⁻⁷ | CSP 10 ⁻⁷ |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|

Figura 2- Concentrações de “CuShydPhen” que foram testadas.

4. Resultados

4.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do complexo de cobre derivado de Tiofeno 2-carbohidrazida 1,10 fenantrolina (CuShydPhen) pelo ensaio de Alamar blue

Para a avaliação da citotoxicidade do complexo “CuShydPhen” frente às linhagens tumorais B16-F10 e sarcoma 180 (TG180), foi utilizado o ensaio de Alamar blue. Este ensaio se trata de um teste colorimétrico, onde a ocorrência da cor rosa indica a redução da resazurina (coloração azul- não fluorescente) para resorufina (coloração rosa- extremamente fluorescente), como pode ser observado na Figura 3, que é referente à parte superior da microplaca onde foram dispostas as células da linhagem TG180 para o teste do composto CuShydPhen. Para a obtenção de dados quantitativos, foi realizada a leitura ótica em espectrofotômetro a dois comprimentos de onda diferenciados, 570nm e 600nm.

As análises indicaram que o composto “CuShydPhen” foi citotóxico para as linhagens testadas, o que pode ser visualmente observado pelo gradiente colorimétrico, onde há a variação de tons de azuis para o rosa, sendo que quanto maior a intensidade da cor azul mais células inviáveis (mortas) e em contrapartida, quanto mais rosa maior a quantidade de células viáveis.

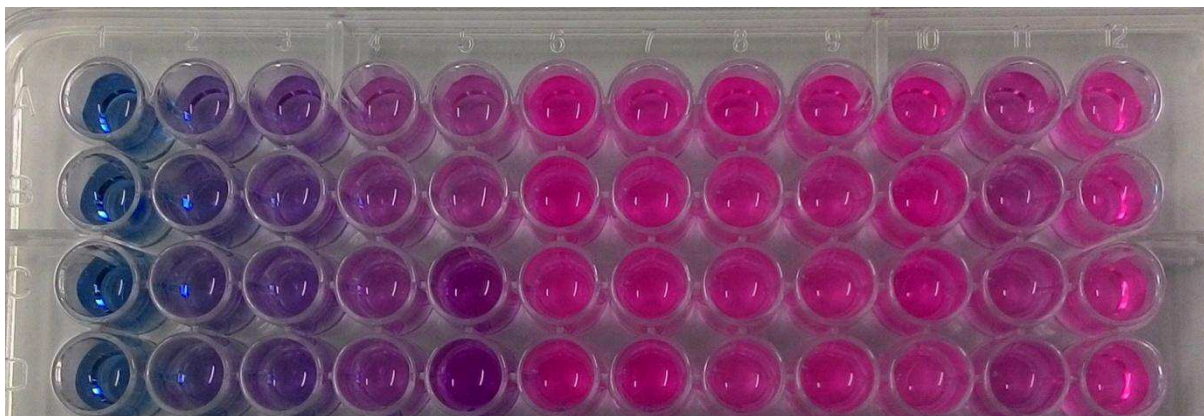


Figura 2- Foto representativa do gradiente colorimétrico em relação à concentração de células viáveis de TG180. Esta concentração aumenta da esquerda (coloração azul) pra direita (coloração rosa).

A leitura espectrofotométrica forneceu os dados necessários para se calcular a porcentagem de células viáveis e calcular a dose necessária para reduzir-se 50% da viabilidade celular (IC_{50}), que foi de $23\mu M$ na linhagem B16-F10, e de $40\mu M$ para TG180, e, ao se plotar os gráficos obtivemos uma curva dose-dependente (Figura 3).

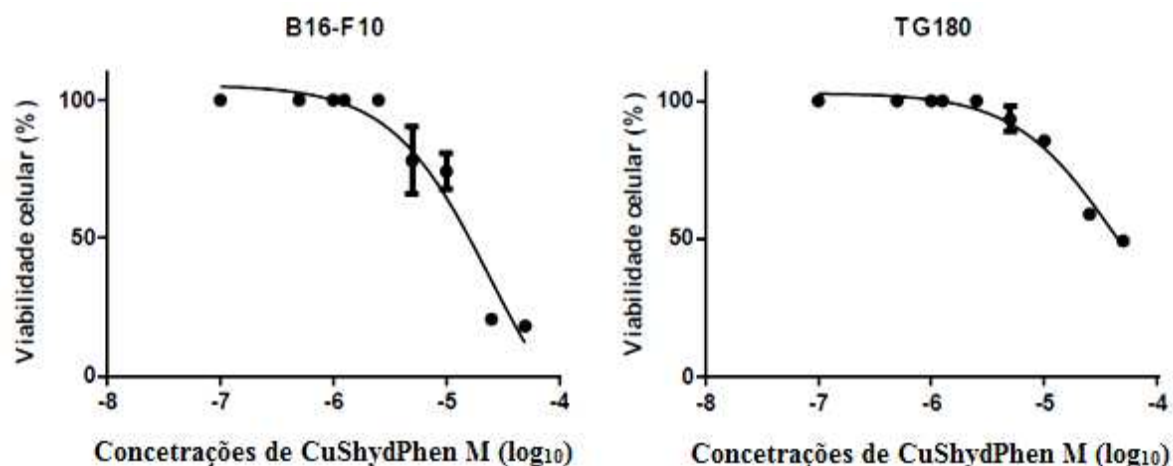


Figura 3: Curva dose-resposta da viabilidade das linhagens celulares B16-F10 e TG180, tratadas com complexo de cobre derivado de tiofeno 2-carbhidrazida 1,10 fenantrolina (CuShydPhen). Cada ponto representa média \pm erro padrão de triplicatas, com intervalo de confiança de 95%. A figura demonstra uma curva dose-dependente.

5 DISCUSSÃO

O conjunto de modificações na homeostase celular que acarreta em uma série de mudanças capazes de interferir na habilidade adaptativa das células, assim como no seu metabolismo além de prejudicar sua sobrevivência e reprodução foi definido como citotoxicidade (NARDONE, 1997).

O potencial citotóxico dos complexos de cobre foi considerado promissor diante linhagens tumorais B16-F10 e TG180 cultivadas *in vitro*, segundo pesquisas que

tinham como objetivo testá-los (SILVA *et al.*, 2011). No presente trabalho foi avaliado o potencial da atividade citotóxica do complexo metálico tiofeno 2-carbohidrazida 1,10-fenantrolina (CuShydPhen) frente as linhagens tumorais murinas B16-F10 e TG180.

Quando se amplia a citotoxicidade para o nível tecidual sabe-se que este quadro é dependente de vários fatores, tais como o tipo de linhagem celular testada, a habilidade do composto de adentrar nas células, concentração da substância testada, o tempo de exposição do alvo, entre outras (HU & HSIUNG, 1989).

Em relação ao local de ação do complexo metálico de Cobre (II), crê-se o elemento metálico liga-se ao sulco maior da molécula de DNA, acarretando em ROS, fruto de sua interação com o ácido desoxirribonucléico, culminado assim em danos pela oxidação desta molécula (SILVA *et al.*, 2011). O estresse oxidativo proporciona clivagens no DNA, assim impossibilitando a proliferação celular, de acordo com os testes realizados com o composto “*CushydPhen*” foi possível saber que sua citotoxicidade está relacionada a estes acontecimentos.

Ao se comparar os resultados de citotoxicidade na aplicação do *CuShydPhen* sobre as linhagens tumorais metastáticas B16-F10 e TG180 foi possível observar uma grande diferença entre as duas linhagens, sendo que o sarcoma apresentou um IC₅₀ maior do que o melanoma murino, sendo respectivamente 40 µM e 23 µM.

Tal fato pode ser explicado pela seletividade celular, que, como em testes realizados por Silva e colaboradores (2010) ao analisar a citotoxicidade [PtCl₂(dox)] e [PtCl₂(tc)] em duas linhagens tumorais murinas, leucemia mieloide crônica e macrófagos foi constatado que as concentrações dos compostos que interferiam na viabilidade celular das células mieloides não afetavam a viabilidade dos macrófagos. Outros dados na literatura demonstraram a seletividade de células aos compostos metálicos testados. Mello *et al.* (2012) comparou a capacidade citotóxica do rutênio

complexada a aminoácidos, RuGly e RuTrp, em células de fibroblasto de mama (L-929) e tumor Ehrlich (carcinoma mamário murino). Os compostos apresentaram citotoxicidade na linhagem de câncer de mama murino porém não demonstraram o mesmo efeito quando comparado os resultados com os fibroblastos L-929, ou seja houve uma seletividade positiva em relação ao composto pelo tumor de Ehrlich, em contrapartida este fato não foi observado na linhagem L-929.

Quanto ao potencial citotóxico do tiofeno 2-carbohidrazida 1,10 fenantrolina (CuShydPhen) em TG 180: seu IC₅₀ foi de 40 µM, valor inferior se comparado a da cisplatina em teste realizado por Mello *et al.* (2011) que chegou ao valor de 48,11 µM para a inibição de 50% da viabilidade celular da linhagem de sarcoma murino.

Os resultados obtidos indicaram que o complexo metálico “CuShydPhen” apresenta respostas dose-dependentes e é relevantemente citotóxico, em relação ao grupo controle de viabilidade. Desta maneira, o complexo “CuShydPhen” demonstrou um resultado relevante perante ao antineoplásico (cisplatina) que é usualmente aplicado no processo terapêutico oncológico.

Os resultados obtidos neste trabalho propiciam uma base para futuras investigações com o complexo “CuShydPhen”, tais como ensaios de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* além de ensaios com células não tumorais, para monitorar-se como o complexo estudado se comporta com células normais do organismo.

6. Conclusão

Os testes preliminares realizados no presente trabalho indicaram que o composto de cobre testado é promissor candidato para o desenvolvimento de um novo agente quimioterápico. A dose capaz de reduzir 50% da viabilidade celular (IC50) foi de 40 μ M em TG180 e 23 μ M em B16-F10. Esses resultados obtidos indicaram relevante citotoxicidade dose-dependente do complexo metálico.

7. Referências

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2010. Atlanta: American Cancer Society, 2010.

_____. A guide to cancer Surgery – Learning about surgery. 2014a. Disponível em <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003022-pdf.pdf>>. Acessado em: setembro de 2016.

_____. Society. Radiation Therapy What It Is, How It Helps. 2014b. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003299-pdf.pdf>>. Acessado em: setembro 2016.

COSTA, E. C.; et al. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ Universidade Estadual do Ceará. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, 2008, p. 25–31.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T. e BERALDO, H. A Química inorgânica na terapia do câncer. **Química nova**, v. 6, p.2-7, 2005.

GADELHA, M. I. P., WERNECK, M. A. S., LIMA, D. P., TOMASSINI, E., PANITZ, L. M., FAILLACE, T. F. L. **Manual de bases técnicas da oncologia – SIA/SUS – Sistema de informações ambulatoriais**. Brasília: Ministério da Saúde, 17ª Edição, 2014, 120p.

HIGUCHU, C. T. **Byrsonima spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados**. Araraquara, 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, 2007.

HU, J. M., HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: *in vitro* perspectives. **Antiviral Research Journal**. 11 (5-6): 217-232, 1989.

LORENCETTI, A., SIMONETTI, A. P. As estratégias de enfrentamento de pacientes durante o tratamento de radioterapia. **Ver. Latino-am Enfermagem**. Novembro-Dezembro; 13(6):944-50, 2005.

MALONE, D. J., LINDSAY, K. L. B. **Physical Therapy in acute Care. A clinician's guide**. United States: Slack Incorporated, 2006 p. 503 – 544.

MEDEIROS, I. P. S. **Estudo do potencial antitumoral de alguns complexos de Pt(II), Cu(II) e Ga(III)**. Belo Horizonte, 2011. 115f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

MELLO, F. M . S, LIMA, A. P., LACERDA, E. P. S. **Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade de células de sarcoma 180 tratadas com um novo complexo de rutênio**. 63º Reunião Anual da SBPC, 2011.

MELLO, F. M. dos S.; LIMA, A. P.; PORTO, H. K. P.; LACERDA, E. de P. S. Seletiva atividade de cito e genotoxicidade de compostos de rutênio coordenados com aminoácidos em modelos celulares murinos *in vitro*. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, São Luís. **Anais da 64ª Reunião anual da SBPC**. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2012.

NARDONE, R. M.. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G.H, CRISTOFALO, V. J. (Eds.). **Growth, nutrition and metabolismo of cells culture**. New York: Academic, 417-495, 1977

NATIONAL INSTITUTE OF CANCER. Chemotherapy and You: Support for People With Cancer. Disponível em<<http://www.cancer.gov/cancertopics/coping/chemotherapy-and-you/>>. Acessado: janeiro 2015. Versão: 29 de Junho de 2007b.

POLICARPI, E. B. **Síntese, caracterização e estudo de interação com o DNA de novos complexos de cobre(II) com ligantes planares aromáticos**. Florianópolis, 2011. 127f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

SILVA, P. P. et al,. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. **Inorganic chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414–24, 2011.

SILVA, P.P, PEREIRA-MAIA, E. C. **Síntese, caracterização citotóxica de complexos ternários Cu(II) com tiofeno 2-carbohidrazida e 1,10-fenantrolina ou 2,2'-bipiridina**. Anais: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

SILVA, S. P. **Progressos recentes e perspectivas futuras dos compostos metálicos com atividade anti-tumoral**. Porto, 2012. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, 2012.

TISATO, F. et al. Copper in Diseases and Treatments, and Copper-Based Anticancer Strategies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 4, p. 708-749, 2010.

THULER, L. C. S. Instituto Nacional de Câncer (INCA), **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2011. p. 128.