

ATIVIDADE CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E ANTITUMORAL DO COMPOSTO (E)-2-(((4-NITROFENIL)IMINO) METIL) FENOL

Beatriz Cardoso Roriz^{1*}, Danieli Fernanda Buccini², Suellen Rolon de Souza Silva² Nelson Luís de Campos Domingues³, Susana Elisa Moreno⁴

1. Doutoranda em Biotecnologia e Biodiversidade pela rede Pró Centro-Oeste - UFMS
2. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - UCDB
3. Docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade - UFGD
4. Docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - UCDB/Orientador

Resumo

O presente trabalho tem por objetivo avaliar as propriedades citotóxica, genotóxica e antitumoral do composto (E)-2-(((4-nitrofenil)imino)metil)fenol (ENMiF). Foi realizado ensaio hemolítico em eritrócitos murinos incubados com diferentes concentrações do composto. A viabilidade celular foi aferida pelo ensaio colorimétrico do MTT em linfócitos e células do TAE incubados por 24 e 48h com o composto. A avaliação de genotoxicidade foi realizada através da presença de micronúcleos em camundongos. O ENMiF não apresentou atividade hemolítica em eritrócitos murinos em nenhuma das concentrações testadas; não alterou a viabilidade de linfócitos em 24h, no entanto, reduziu em cerca de 60% a viabilidade do TAE em 24 e 48h. O composto não apresentou atividade genotóxica. Os resultados mostraram que o ENMiF possui atividade antitumoral promissora não causando dano às células normais. Novos testes devem ser realizados a fim de esclarecer os mecanismos de ação envolvidos.

Autorização legal: Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Católica Dom Bosco nº 031/2017

Palavras-chave: Bases de Schiff, Iminas, compostos sintéticos.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Introdução

A descoberta de fármacos desempenha um papel importante para a sociedade e para a indústria farmacêutica, visando melhorar o valor terapêutico por meio do lançamento de produtos mais eficientes e seguros no mercado. Infelizmente, a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas é um processo longo, complexo e oneroso. Ela envolve a identificação, síntese, caracterização, triagem e ensaios pré-clínicos e clínicos de candidatos a fármacos (Tomar *et al.*, 2018). Nesse âmbito, as ferramentas biotecnológicas associadas à química medicinal tem auxiliado no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica. O design racional de fármacos surge como uma alternativa na busca por novos medicamentos e complementa a abordagem clássica, em que novos fármacos são descobertos por acaso. Isso é possível graças aos avanços nas áreas da biologia e química, além da melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de patologias e dos modelos experimentais de estudo de doenças. Nesse contexto, o planejamento de fármacos surge como uma estratégia para o desenvolvimento e otimização de biomoléculas ativas, sobretudo em características como potência, afinidade e seletividade (Guido, R. *et al.*, 2010; Tseng e Tuszynski, 2015)

As Iminas, também chamadas de azometinas ou bases de Schiff, são compostos que possuem o grupo funcional (–C=N–), e foram descritas pela primeira vez por Hugo Schiff. Compostos derivados das iminas formam uma classe importante de compostos orgânicos que tem ganhado importância na área médica e farmacêutica devido às várias atividades farmacológicas relatadas, como: atividade antitumoral (Hu *et al.*, 2012; Ceyhan *et al.*, 2015), anti-inflamatória (Sondhi *et al.*, 2006), analgésica (Pandey *et al.*, 2012), nematicida (Al-Kahraman *et al.*, 2011), antimicrobiana (Abirami e Nadaraj, 2015) entre outros.

Na busca por novos alvos farmacêuticos, as iminas são compostos de interesse para o desenvolvimento de novas drogas, por possuírem várias aplicações na área biológica. Dessa forma, o presente trabalho visou avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e potencial antitumoral da imina sintética (E)-2-(((4-nitrofenil) imino) metil) fenol (ENMiF), em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Metodologia

O Composto utilizado foi o (E)-2-(((4-nitrofenil)imino)metil)fenol, sintetizado no Lacob – Laboratório de Catálise Orgânica e Biocatálise da UFGD.

Para os ensaios, foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas, com 18-22 g, provenientes do biotério da UCDB. Os animais foram mantidos em temperatura 22 °C e ciclo claro/escuro controlados, com água e ração *ad libitum*.

Para o ensaio hemolítico, foram utilizados eritrócitos murinos de acordo com Park *et al.* (2004). Diferentes concentrações do composto (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL) foram avaliadas. O controle positivo recebeu Triton X-100 (Vetec) e o controle negativo recebeu Salina (0,9%), incubado a 37°C durante uma hora e

realizada leitura a 415nm em leitor de microplacas (SpectraMax F3, Molecular Divices).

Para os ensaios de atividade antitumoral, as células do Tumor ascítico de Erlich (TAE) foram descongeladas, centrifugadas e um volume de 200µl de células injetado intraperitonealmente em dois camundongos a cada sete dias para manutenção das células *in vivo*. Para condução dos ensaios, as células foram retiradas do lavado peritoneal, lavadas e centrifugadas. Posteriormente, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripán, descrito por Strober,(1997). As células foram consideradas adequadas aos experimentos se apresentassem viabilidade $\geq 90\%$.

Para a obtenção dos linfócitos murinos, um animal foi eutanasiado por aprofundamento anestésico (Cetamina 150mg/Kg/ Xilazina 20mg/Kg), retirado o baço, lavado em álcool 70% e emergido em meio de cultura RPMI. O baço foi macerado e centrifugado por 10 min a 4°C. Posteriormente, foi adicionado tampão de lise (EDTA; NaHCO₃; NH₄Cl) durante 2 minutos e novamente as células foram centrifugadas. Foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripán e as células foram consideradas adequadas aos experimentos se apresentassem viabilidade $\geq 90\%$.

O citotoxicidade foi determinada por meio do ensaio colorimétrico do MTT, de acordo com Takeuchi e Kobata, (1991), com modificações segundo Sieuwerts *et al.*,(1995) . Para o ensaio, uma suspensão de células (Linfócitos e células TAE), contendo aproximadamente 1×10^5 células/mL, foram colocadas em placas de 96 poços e incubadas com meio RPMI contendo 100, 50 e 25µg/mL do composto e mantidas em estufa de CO₂ 5%, á 37°C. A viabilidade celular foi avaliada nos períodos de 24 e 48 horas após a incubação. Após, foi realizada leitura a 540nm em leitor de microplacas (SpectraMax F3, Molecular Divices).

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com Schmid (1975). Os animais (n=6) foram tratados intraperitonealmente com a concentração de 100µg/animal do composto ENMiF, salina 0,9% (0.2 mL) e Colchicina (5mg/kg 0.2 mL). Após um período de 24h foram produzidas lâminas de esfregaço sanguíneo, fixadas e corados com May Grunwald e Giemsa 10%. Foram contados 2.000 eritrócitos por lâmina, diferenciando em policromáticos com ou sem micronúcleos. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico. Em todos os ensaios, a análise estatística utilizada foi One-way ANOVA, seguida pelo pós teste de Bonferroni; o nível de significância para os testes foi considerado quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

No ensaio de hemólise, eritrócitos murinos foram incubados com diferentes concentrações do composto ENMiF. A fim de avaliar seu potencial citotóxico. Nas concentrações testadas (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL), o composto não apresentou atividade hemolítica (Figura 1) comparado ao controle positivo Triton X-100. O ensaio hemolítico é baseado na medição da liberação de hemoglobina de eritrócitos suspensos em solução, e a concentração de hemoglobina liberada está correlacionada com a percentagem de células lisadas.

Os eritrócitos representam as principais células do sistema circulatório, e alterações hematológicas servem como indicador para triagem dos impactos tóxicos de xenobióticos nos tecidos. Substâncias tóxicas podem induzir dano direto ou indireto ao citoesqueleto de hemácias perturbando o metabolismo celular e a permeabilidade iônica, levando a anormalidades em sua morfologia (Farag e Alagawany, 2017). Dessa forma, mostramos que, nas concentrações testadas, o composto não resultou em efeito tóxico aos eritrócitos murinos.

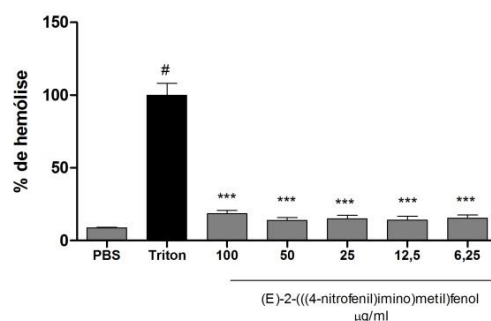


Figura 1. Atividade hemolítica do composto (E)-2-(((4-nitrofenil)imino)metil)fenol sobre eritrócitos murinos. Os resultados são expressos em percentagem de hemólise. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle positivo Triton X-100 (#). A análise estatística usada foi one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

A fim de investigar a viabilidade celular de células tumorais e normais incubadas com o ENMiF em diferentes períodos, realizou-se o ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT), teste comumente utilizado para determinar a citotoxicidade de substâncias teste em meio de cultivo celular. Os resultados mostram que frente a células normais, o composto em 24h (Figura 2A) não alterou a viabilidade celular nas três concentrações testadas. No período de 48h, a viabilidade celular reduziu cerca de 30% na concentração de 100 e 50µg/mL, e cerca de 20% na concentração de 25µg/mL (Figura 2B). Nas células tumorais, o composto reduziu significativamente a viabilidade em comparação ao controle não tratado. Em 24 horas, a viabilidade celular reduziu em cerca 70, 60, 30% nas concentrações de 100, 50 e 25µg/mL, respectivamente (Figura 2C). Em 48h, a viabilidade permaneceu reduzida em cerca de 60%, nas três concentrações testadas (Figura 2D).

Dessa forma, os resultados mostram que o composto possui ação antitumoral em 24 e 48h, e não alterou a viabilidade das células normais no período de 24h.

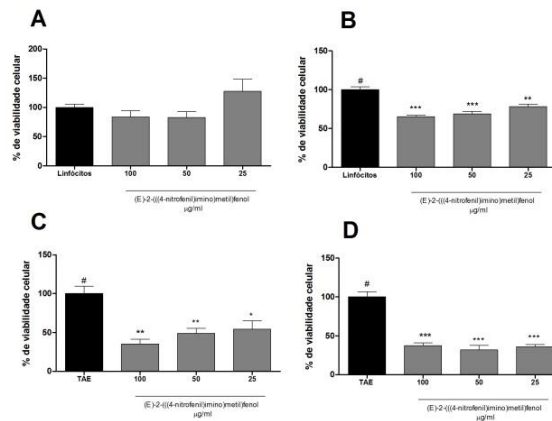


Figura 2. Viabilidade celular do composto (E)-2-(((4-nitrofenil)imino)metil)fenol frente linfócitos e tumorais. A viabilidade foi mensurada no período de 24h e 48h através do ensaio de MTT. (A) e (B) viabilidade de linfócitos em 24 e 48h, respectivamente. (C) e (D) Viabilidade celular de células do tumor ascítico de Erlich (TAE) em 24 e 48h, respectivamente. Os resultados são expressos em porcentagem de células viáveis * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle sem tratamento (#). A análise estatística usada foi one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

As iminas ou bases de Schiff são compostos que tem despertado interesse graças ao espectro de atividades farmacológicas que possuem, e o desenvolvimento de compostos quimioterápicos a partir de iminas atraem a atenção de químicos medicinais (Ceyhan *et al.*, 2015). As bases de Schiff são alvos farmacêuticos comuns no design e desenvolvimento de agentes antitumorais (Hu *et al.*, 2012), e vários trabalhos comprovam essa atividade contra diversas linhagens de células cancerígenas (Sztanke *et al.*, 2013; Emam *et al.*, 2017). A atividade antitumoral pode estar relacionada com o grupo inserido da estrutura molecular da base. Segundo Ceyhan *et al.* (2015) os grupos metoxi- e hidroxí- quando inseridos em bases de Schiff podem ter potencial antitumoral.

O teste de micronúcleo (MNs) foi utilizado com o objetivo de avaliar a capacidade genotóxica do composto (E)-2-(((4-nitrofenil)imino)metil)fenol. Os dados mostram que o composto não aumentou a produção de MNs no período de 24h, diferindo estatisticamente do grupo tratado com Colchicina (Figura 3). A Colchicina é um fármaco aneugênico bem conhecido, e utilizado em ensaios de micronúcleo, pois induz sua produção em diferentes tipos celulares (Lotfi e Machado-Santelli, 1996).

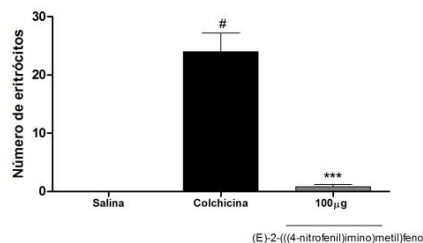


Figura 3. Avaliação da presença de micronúcleos em camundongos tratados com o composto (E)-2-(((4-nitrofenil)imino)metil)fenol. Os animais foram tratados com 100µg/animal e após 24 horas, o número de micronúcleos foi obtido a partir de lâminas do esfregaço sanguíneo dos animais. Os resultados são expressos em número de micronúcleos em 2000 células.*** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle tratado com colchicina (#). A análise estatística usada foi one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

A presença de MNs indica mutações do genoma, isto é, alterações cromossômicas transmitidas às células-filhas (Hintzsche *et al.*, 2017). Os testes de genotoxicidade são úteis para descrever a capacidade de diferentes xenobióticos em danificar a informação genética celular e induzir a mutação. Dessa forma, mostramos que o ENMiF não foi genotóxico na concentração utilizada de 100µg.

Conclusões

Os experimentos relatados mostram que o composto (E)-2-(((4-nitrofenil)imino)metil)fenol não possuiu efeito citotóxico frente a eritrócitos e linfócitos murinos *in vitro*, e não apresentou atividade genotóxica *in vivo*. O composto ainda apresentou atividade antitumoral satisfatória *in vitro*, mostrando-se um candidato a pesquisas de fármacos antitumorais. Os resultados obtidos justificam estudos mais aprofundados acerca desse composto.

Referências bibliográficas

ABIRAMI, M.; NADARAJ, V. Antimicrobial activity of salicylaldehyde Schiff bases. *International Journal of PharmTech Research*, v. 8, n. 4, p. 558-561, 2015.

AL-KAHRAMAN, Y. et al. Nematicidal Efficacy of Schiff Bases Derived from Aryl and/or Heteroaryl Carboxaldehydes. *World Journal of Chemistry*, v. 6, p. 19-24, 2011.

- CEYHAN, G. et al. Anticancer, photoluminescence and electrochemical properties of structurally characterized two imine derivatives. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 149, p. 731-743, 2015. ISSN 1386-1425.
- EMAM, S. M. et al. Synthesis, characterization and anticancer activity of new Schiff bases bearing neocryptolepine. **Journal of Molecular Structure**, v. 1146, p. 600-619, 2017. ISSN 0022-2860.
- FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-biological interactions**, 2017. ISSN 0009-2797.
- GUIDO, R.; ANDRICOPULO, A.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: Applications in infectious diseases. **Adv. Stud**, v. 24, p. 70, 2010.
- HINTZSCHE, H. et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85-98, 2017. ISSN 1383-5742.
- HU, G. et al. Design, synthesis and antitumor activities of fluoroquinolone C-3 heterocycles (IV): s-triazole Schiff–Mannich bases derived from ofloxacin. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 3, p. 312-317, 2012. ISSN2211-3835.
- LOTFI, C. F. P.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Comparative analysis of colchicine induced micronuclei in different cell types in vitro. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 349, n. 1, p. 77-83, 1996. ISSN 0027-5107.
- PANDEY, A. et al. Synthesis of Schiff bases of 2-amino-5-aryl-1, 3, 4-thiadiazole and its analgesic, anti-inflammatory and anti-bacterial activity. **Journal of Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 2524-2531, 2012. ISSN 0973-4945.
- PARK, Y. et al. Design of novel analogues with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, HP (2-9)-ME (1-12). **Biotechnology letters**, v. 26, n. 6, p. 493-498, 2004. ISSN 0141-5492.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 9-15, 1975.
- SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 33, n. 11, p. 813-824, 1995. ISSN 1437-4331.
- SONDHI, S. M. et al. Synthesis, anti-inflammatory, analgesic and kinase (CDK-1, CDK-5 and GSK-3) inhibition activity evaluation of benzimidazole/benzoxazole derivatives and some Schiff's bases. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3758-3765, 2006. ISSN 0968-0896.
- STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 21, n. 1, p. A. 3B. 1-A. 3B. 2, 1997. ISSN 1934-3671.
- SZTANKE, K. et al. An insight into synthetic Schiff bases revealing antiproliferative activities in vitro. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3648-3666, 2013. ISSN 0968-0896
- TAKEUCHI, M.; KOBATA, A. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. **Glycobiology**, v. 1, n. 4, p. 337-346, 1991. ISSN 1460-2423.
- TSENG, C.-Y.; TUSZYNSKI, J. A unified approach to computational drug discovery. **Drug discovery today**, v. 20, n. 11, p. 1328-1336, 2015. ISSN 1359-6446.