



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS



CAMILA DE MELO ROMERO ROCHA

**Avaliação dos efeitos tóxicos de novas substâncias bioativas: detecção de  
estresse oxidativo e mutagenicidade**

São Carlos

2018

CAMILA DE MELO ROMERO ROCHA

**Avaliação dos efeitos tóxicos de novas substâncias bioativas: detecção de estresse oxidativo e mutagenicidade**

**VERSÃO CORRIGIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

*Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da  
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).*

R672a Rocha, Camila  
Avaliação dos efeitos tóxicos de novas substâncias  
bioativas: detecção de estresse oxidativo e  
mutagenicidade / Camila Rocha; orientador Andrei  
Leitão. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração  
em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de  
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,  
2018.

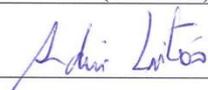
1. Espécies reativas de oxigênio (ROS). 2.  
Expressão enzimática. 3. Teste Ames. 4.  
Antiparasitários. 5. Antineoplásicos. I. Título.

**CAMILA DE MELO ROMERO ROCHA**

Título: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE NOVAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS: DETECÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO E MUTAGENICIDADE".

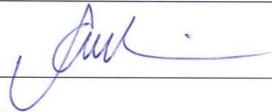
DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 22/03/2018

Prof. Dr. Andrei Leitão (Orientador)	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura: 	Não votante

Profª. Dra. Fernanda Canduri	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura: 	Resultado: APROVADA

Profª. Dra. Eny Maria Vieira	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura: 	Resultado: APROVADO

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha	Universidade Federal de São Carlos
Assinatura: 	Resultado: APROVADO

Homologado em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

*Dedico este trabalho à minha avó  
Cleusa, por ser minha inspiração de  
bondade, amor e dedicação...*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e por sempre confiarem em mim.

Ao meu noivo e companheiro de laboratório Murillo, que contribuiu nos experimentos, esteve o tempo todo ao meu lado, me dando incentivo e suporte nos momentos de dificuldade, além de ser a minha inspiração diária para buscar sempre evoluir profissional e pessoalmente.

Ao Prof. Dr. Andrei Leitão, que me recebeu muito bem em seu laboratório e me orientou neste trabalho, contribuindo muito para o meu crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari, por me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa e trabalhar em seu laboratório.

Aos meus colegas do Grupo NEQUIMED, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial aos amigos Daiane, Ariel, Talita e Pedro que dividiram o laboratório e os momentos de dificuldades e conquistas ao longo desse período.

Ao meu amigo e colega de laboratório Junior, que contribuiu para o meu crescimento científico, orientou nas minhas produções acadêmicas, além de ser um companheiro em todos os momentos nessa e nas futuras etapas da minha vida.

Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, pela colaboração com os experimentos e por me permitir aprender novas técnicas em seu laboratório, contribuindo para o meu crescimento científico.

À Me. Carla Peres de Paula e à Me. Karina Lopes Teixeira pela colaboração com os ensaios qRT-PCR e Western blot e pela disposição e dedicação em me passar seus conhecimentos.

À Companhia de Dança CAASO, que foi essencial nessa fase da minha vida, me proporcionando estar próxima a uma das minhas maiores paixões, que é dançar, além de me trazer grandes amizades.

Às agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro.

## RESUMO

ROCHA, C. M. R. **Avaliação dos efeitos tóxicos de novas substâncias bioativas: detecção de estresse oxidativo e mutagenicidade.** 2018. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos sistemas biológicos é contrabalanceada pelos sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Quando há um desequilíbrio entre a geração de ROS e esses sistemas, ocorre um aumento dessas espécies reativas causando estresse oxidativo, que pode levar a danos a macromoléculas, como lipídios, proteínas e o DNA. Os fármacos doxorubicina (antineoplásico) e benzonidazol (antiparasitário) são conhecidos por induzir efeitos colaterais que podem estar relacionados ao aumento de ROS. Além disso, ensaios de mutagenicidade demonstram que esses fármacos apresentam atividade mutagênica por danos oxidativos. O Grupo NEQUIMED desenvolve substâncias com potencial atividade antineoplásica e antiparasitária, as quais ainda não foram avaliadas em relação às propriedades tóxicas e genotóxicas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar as propriedades mutagênicas e de estresse oxidativo dessas novas substâncias, comparando aos fármacos benzonidazol e doxorubicina. Para detecção de ROS foi realizado o ensaio fluorimétrico utilizando o marcador 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) em linhagens celulares de hepatocarcinoma humano (HepG2) e fibroblasto de camundongo (Balb/C 3T3 clone A31). O estado redox destas células foi avaliado através da quantificação da expressão gênica e do conteúdo proteico das enzimas antioxidantes através das técnicas de qRT-PCR e Western blot, respectivamente. A atividade mutagênica foi analisada com o ensaio Ames miniaturizado *Salmonella*/microsoma utilizando a linhagem TA102 de *Salmonella typhimurium* que detecta agentes mutagênicos que causam danos por oxidação. Os resultados mostraram que as substâncias estudadas pelo Grupo não induzem aumento na produção de ROS ou induzem em menores níveis do que doxorubicina e benzonidazol, além de levar a alterações menos proeminentes que os fármacos para a expressão das proteínas antioxidantes. No ensaio mutagênico, o benzonidazol apresentou o pior perfil, doxorubicina e Neq0438 somente foram mutagênicos com ativação enzimática, enquanto Neq0551 foi inativo. Assim, as novas substâncias (Neq0438 e Neq0551) apresentaram um perfil melhor do que os fármacos de referência, tornando-os candidatos promissores para estudos *in vitro* e *in vivo* subsequentes.

**Palavras-chave:** Espécies reativas de oxigênio (ROS). Expressão enzimática. Teste Ames. Antiparasitários. Antineoplásicos.

## ABSTRACT

ROCHA, C. M. R. **Evaluation of the toxic effects of new bioactive substances: oxidative stress detection and mutagenicity.** 2018. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The production of reactive oxygen species (ROS) in biological systems is compensated by the enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. The excessive ROS production causes oxidative stress, which can damage important cellular macromolecules such as lipids, proteins and DNA. The drugs doxorubicin (antineoplastic) and benzonidazole (antiparasitic) are both known for their side effects, which can be related to the increase of ROS. Besides, mutagenicity assays show that these drugs have a mutagenic activity via oxidative damages. The research group NEQUIMED studies new substances with potential antineoplastic and antiparasitic activities, but their toxic and genotoxic properties have not been fully evaluated yet. Thus, the aim of this work is to assess the mutagenic potential and the oxidative stress generated by these substances, comparing them to benzonidazole and doxorubicin. The fluorimetric assay using the probe dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) was used for ROS detection in human hepatocarcinoma (HepG2) and mouse fibroblast (Balb/C 3T3 clone A31) cell lines. The redox state of these cells was evaluate by qRT-PCR and Western blot methods to quantifying gene expression and protein content of the antioxidant enzymes. The mutagenic potential was assessed by the miniaturized Ames test with the *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, using the TA102 strain of *Salmonella typhimurium*, which detects oxidation damages to the DNA. The new substances did not induce an increase on ROS production, or did in lower levels when compared to doxorubicin and benzonidazole. Moreover, reference drugs also induced greater changes on the expression of the antioxidant enzymes. Benznidazole had a higher mutagenic activity, while Neq0438 and doxorubicin were mutagenic only when incubated with enzymatic activation. Neq0551 was inactive for Ames assay. Therefore, these new substances (Neq0438 and Neq0551) had a better overall profile than the reference drugs, turning out to be promising candidates for further in vitro and in vivo studies.

**Keywords:** Reactive oxygen species (ROS). Enzyme expression. Ames test. Antiparasite. Antineoplastics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Fontes de formação de ROS.....	24
<b>Figura 2.</b> Sistema antioxidante presente na célula: geração e neutralização de espécies reativas de oxigênio (a) e esquema simplificado da integração de enzimas no mecanismo redox (b). .....	27
<b>Figura 3.</b> Mecanismo proposto para a atividade intracelular do DCFH-DA.....	29
<b>Figura 4.</b> Exemplos de mutações por substituição e por <i>frameshift</i> . .....	30
<b>Figura 5.</b> Protocolo do teste de flutuação em placas multi-poços. ....	33
<b>Figura 6.</b> Formação de ROS pelo controle positivo (DCFH-DA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em relação ao controle negativo (sem a presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). .....	53
<b>Figura 7.</b> Células HepG2 sem tratamento (controle negativo) e tratadas com 500 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> após 30 minutos de incubação com 500 µM de DCFH-DA.....	53
<b>Figura 8.</b> Superfície resposta e condição ótima atingida para as três variáveis analisadas em HepG2 (A, B, C) e fibroblastos (D, E, F). A coloração representada por > 1 abrange a região com as condições ótimas para cada combinação das variáveis. A e D) Combinação das concentrações do DCFH-DA com os tempos de incubação. B e E) Combinação das concentrações do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> com os tempos de incubação. C e F) Combinação das concentrações do DCFH-DA e do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....	54
<b>Figura 9.</b> Detecção de ROS em células HepG2 e fibroblastos tratados com doxorrubicina (Doxo) e benzonidazol (Benz) por 24 horas. Como controle positivo foi utilizado o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em 500 µM e como controle negativo foram utilizadas as linhagens celulares sem tratamento, sendo considerado como 100%. p*** < 0,001; p* < 0,005.....	55
<b>Figura 10.</b> Detecção de ROS nas substâncias em estudo pelo grupo NEQUIMED e nas substâncias de referência benzonidazol (Benz) e doxorrubicina (Doxo). O H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> foi utilizado como controle positivo em 500 µM. p* < 0,005; p*** < 0,001.....	57
<b>Figura 11.</b> Detecção de ROS após tratamentos de 6, 24 e 48 horas com as substâncias Neq0438, Neq0551 e benzonidazol (Benz) em 10 µM e doxorrubicina (Doxo) em 0,1 µM. p* < 0,005; p*** < 0,001.....	58
<b>Figura 12.</b> Detecção de ROS em esferoides de HepG2 tratados por 24 e 48 horas com as substâncias. Como controle positivo foi utilizado o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em 500 µM e como controle negativo foram utilizados os esferoides sem tratamento. p* = 0,005; p*** = 0,001. ....	60

<b>Figura 13.</b> Esferoides de HepG2 tratados com 500 $\mu$ M de DCFH-DA após 24 horas de tratamento com as substâncias.....	60
<b>Figura 14.</b> Quantificação da expressão gênica das enzimas antioxidantes em células HepG2 por meio do qRT-PCR após tratamento com as substâncias em concentrações de 10 $\mu$ M para o Neq0438, Neq0551 e benzonidazol (Benz) e 0,1 $\mu$ M para doxorubicina (Doxo). Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	63
<b>Figura 15.</b> Western blotting para a quantificação do conteúdo proteico utilizando GAPDH como normalizador endógeno. Os tratamentos foram feitos em concentrações de 10 $\mu$ M para o Neq0438, Neq0551 e benzonidazol (Benz) e 0,1 $\mu$ M para doxorubicina (Doxo). Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Metabólitos de oxigênio (radicais e não radicais). <sup>19</sup> .....	22
<b>Tabela 2.</b> Variáveis usadas para a padronização da detecção de ROS. Três fatores foram considerados: Tempo de incubação (tDCFH-DA), concentração do marcador DCFH-DA ([DCFH-DA]) e a concentração do peróxido de hidrogênio ([H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]). Como controle negativo foram utilizadas as células sem tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....	41
<b>Tabela 3.</b> Descrição das substâncias utilizadas para o ensaio de detecção de ROS. ....	43
<b>Tabela 4.</b> Descrição dos anticorpos utilizados para o Western blot. ....	49
<b>Tabela 5.</b> Características genótípicas e fenotípicas das linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> . <sup>82</sup> .....	50
<b>Tabela 6.</b> Expressão gênica das enzimas após tratamento com o Neq0438 em 10 µM. Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	66
<b>Tabela 7.</b> Expressão gênica das enzimas após tratamento com o Neq0551 em 10 µM. Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	66
<b>Tabela 8.</b> Expressão gênica das enzimas após tratamento com doxorrubicina em 0,1 µM. Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	67
<b>Tabela 9.</b> Expressão gênica das enzimas após tratamento com benzonidazol em 10 µM. Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	67
<b>Tabela 10.</b> Conteúdo proteico expresso após tratamento com o Neq0438 em 10 µM. Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	73
<b>Tabela 11.</b> Conteúdo proteico expresso após tratamento com o Neq0551 em 10 µM. Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	73
<b>Tabela 12.</b> Conteúdo proteico expresso após tratamento com doxorrubicina em 0,1 µM. Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	74
<b>Tabela 13.</b> Conteúdo proteico expresso após tratamento com benzonidazol em 10 µM. Valores dados como porcentagem do controle negativo. ....	74
<b>Tabela 14.</b> Avaliação da eficiência das linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> . ....	78
<b>Tabela 15.</b> Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) da linhagem TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> exposta à diferentes concentrações do Neq0438 com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. p*= 0,05; p***= 0,001.....	79

<b>Tabela 16.</b> Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) da linhagem TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> exposta à diferentes concentrações do Neq0551 com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. p*= 0,05; p***= 0,01.....	79
<b>Tabela 17.</b> Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) da linhagem TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> exposta à diferentes concentrações de doxorrubicina com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. p*= 0,05; p***= 0,01.....	80
<b>Tabela 18.</b> Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) da linhagem TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> exposta à diferentes concentrações de benzonidazol com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. p*= 0,05; p***= 0,01.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	–	Porcentagem
µg	–	Micrograma
µL	–	Microlitro
µM	–	Micromolar
2-AA	–	2-aminoantraceno
2D	–	Bidimensional
2-NF	–	2-nitrofluoreno
3D	–	Tridimensional
4-NQO	–	<i>N</i> -óxido de 4-nitroquinolina
ATP	–	Trifosfato de adenosina
BAC	–	β-Actina
Balb/C	–	Fibroblastos de camundongo
cDNA	–	DNA complementar
CO <sub>2</sub>	–	Dióxido de carbono
Cu	–	Cobre
DCFH-DA	–	Diacetato de dicloro-dihidro- fluoresceína
DEPC	–	Dietil Pirocarbonato
DMEM	–	Meio
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
DP	–	Desvio padrão
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	–	Ferro
GPX	–	Glutaciona peroxidase
GR	–	Glutaciona redutase
GSH	–	Glutaciona reduzida
GSSG	–	Glutaciona oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	–	Peróxido de hidrogênio
HCl	–	Ácido clorídrico
HepG2	–	Carcinoma hepatocelular

HO•	–	Hidroxila
HTS	–	<i>High throughput screening</i>
IM	–	Índice de mutagenicidade
kDa	–	Kilodalton
mRNA	–	RNA mensageiro
NaCl	–	Cloreto de sódio
NEM	–	N-etilmaleimida
NH <sub>2</sub>	–	Grupo amino
nM	–	Nanomolar
NO	–	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	–	Grupo nitro
NP-40	–	Reagente nonidet P-40
O <sub>2</sub>	–	Oxigênio
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	–	Ânion superóxido
°C	–	Grau celsius
PBS	–	Tampão fosfato-salino
pH	–	Potencial hidrogeniônico
PRDXs	–	Peroxirredoxina
RNA	–	Ácido ribonucleico
ROO•	–	Peroxil
ROS	–	Espécies reativas de oxigênio
RPM	–	Rotações por minuto
qRT-PCR	–	PCR em tempo real
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
SOD	–	Superóxido dismutase
TBS/T	–	Solução salina tris-tamponada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Ensaios celulares .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Estresse oxidativo.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Sistema redox .....	21
2.3.2 Espécies reativas de oxigênio.....	22
2.3.3 Sistemas antioxidantes .....	25
2.3.4 Ensaio de detecção de ROS.....	28
<b>2.4 Mutagenicidade.....</b>	<b>29</b>
1.4.1 Ensaio de mutagenicidade <i>Salmonella</i> /microsoma .....	31
<b>1.5 Substâncias em estudo .....</b>	<b>34</b>
1.5.1 Inibidores de cisteíno proteases e da via PI3K/AKT/mTOR .....	34
1.5.3 Substâncias de referência .....	35
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Detecção de ROS.....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Materiais e Reagentes.....	40
3.1.2 Linhagens celulares .....	40
3.1.3 Padronização do ensaio de detecção de ROS .....	40
3.1.4 Triagem das substâncias em estudo .....	43
3.1.5 Detecção de ROS em curta e longa exposição aos tratamentos .....	45
3.1.6 Detecção de ROS em esferoides de HepG2 .....	45
<b>3.2 Avaliação do sistema antioxidante enzimático .....</b>	<b>46</b>
3.2.1 Materiais e reagentes .....	46
3.2.2 Estudo da expressão gênica (qRT-PCR) .....	46
3.2.3 Quantificação do conteúdo proteico intracelular (Western blot) .....	48
<b>3.3 Ensaio de mutagenicidade <i>Salmonella</i>/microsoma.....</b>	<b>49</b>
3.3.1 Materiais e reagentes .....	49
3.3.2 Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	49
3.3.4 Avaliação da eficácia dos controles .....	50

3.3.5 Avaliação das substâncias em estudo.....	51
<b>3.4 Análises estatísticas.....</b>	<b>51</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Detecção de ROS .....</b>	<b>52</b>
4.1.1 Padronização do ensaio de detecção de ROS.....	52
4.1.2 Triagem das substâncias em estudo .....	55
4.1.3 Detecção de ROS em curta e longa exposição aos tratamentos .....	57
4.1.4 Detecção de ROS em esferoides de HepG2 .....	59
<b>4.2 Avaliação do sistema antioxidante enzimático .....</b>	<b>63</b>
4.2.1 Estudo da expressão gênica (qRT-PCR) .....	63
2.2 Quantificação do conteúdo proteico intracelular (Western blot) .....	69
<b>4.3 Ensaio de mutagenicidade <i>Salmonella</i>/microsoma.....</b>	<b>77</b>
4.3.1 Avaliação da eficácia dos controles .....	77
4.3.2 Avaliação das substâncias em estudo.....	78
<b>5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>105</b>

# 1 INTRODUÇÃO

---

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo e de alto custo, no qual a maioria das substâncias falha em fase pré-clínica e clínica de testes. Um dos motivos para esse insucesso está relacionado aos efeitos tóxicos que esses candidatos a fármacos causam quando testados em animais e pacientes. Para minimizar esses problemas, ensaios pré-clínicos vêm sendo aprimorados para melhorar a predição das propriedades dessas novas substâncias.

Existem diversos métodos e técnicas disponíveis para a avaliação de propriedades tóxicas em estágios iniciais no processo de desenvolvimento de fármacos, antes dos testes em animais e humanos. Os ensaios celulares são atualmente uma alternativa bem viável, cuja aplicação de diferentes técnicas tem como finalidade mimetizar as condições *in vivo* e, dessa forma, permitir o estudo de propriedades tóxicas importantes na determinação da segurança dessas substâncias.

O antineoplásico doxorrubicina e o antiparasitário benzonidazol são fármacos comercialmente disponíveis que induzem efeitos adversos aos pacientes. Muitos estudos mostram que esses efeitos indesejados podem estar relacionados com danos oxidativos, visto que ambos causam a elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio. O aumento dessas espécies leva ao estresse oxidativo, podendo causar danos em macromoléculas que compõem a célula como o DNA.

O Grupo de pesquisa NEQUIMED desenvolve estudos com novas substâncias bioativas que atuam como inibidores de cisteíno proteases e inibidores da via PI3K/AKT/mTOR, concedendo-os atividade antiparasitária e antineoplásica. As propriedades químicas e biológicas dessas substâncias vêm sendo avaliadas por diversas técnicas, incluindo os ensaios celulares utilizando culturas em monocamadas e tridimensionais. No entanto, os ensaios para a caracterização da segurança desses inibidores em relação às propriedades tóxicas e genotóxicas ainda estão em estágios iniciais. Dessa forma, este trabalho visa avaliar os danos oxidativos e efeitos mutagênicos dessas substâncias em comparação com os fármacos benzonidazol e doxorrubicina.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 Descoberta e desenvolvimento de novos fármacos

A descoberta e desenvolvimento de novos fármacos envolve um processo longo e complexo que possui um alto custo. Além disso, a maioria das substâncias falha na triagem clínica. Aproximadamente 10% das substâncias que chegam na fase clínica I são aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e os efeitos tóxicos representam uma das maiores causas para a falha dessas novas substâncias quando testadas em pacientes.<sup>1,2</sup> Para minimizar o problema da toxicidade é importante a realização de ensaios pré-clínicos qualificados. Os diversos métodos usados para identificar potenciais riscos associados às moléculas podem ser divididos em três categorias gerais: estudo específico do perfil físico-químico e reatividade química, ensaios *in vitro* de toxicidade e ensaios de farmacologia molecular.<sup>3</sup>

Os ensaios *in vitro* apresentam vantagens como, por exemplo, poderem ser otimizados para ensaios em massa (HTS, *High Throughput Screening*). Desta forma, menores quantidades dos compostos testados e reagentes é necessária, além da própria redução do número de experimentos em animais. No entanto, esses ensaios devem gerar dados de qualidade suficiente para o aumento da probabilidade dessas moléculas serem seguras nas próximas etapas de testes em animais e humanos.<sup>4</sup> A maioria das indústrias farmacêuticas tem focado nos processos tóxicos mais comuns quando testados em humanos, incluindo a hepatotoxicidade, toxicidade cardiovascular e toxicidade no sistema nervoso central.<sup>5</sup>

O efeito genotóxico também é um ponto muito importante a ser avaliado. Os testes designados para esta finalidade buscam identificar substâncias que possam reagir com o DNA e alterar sua estrutura nativa. Essas alterações podem ocorrer por mutações gênicas ou danos cromossômicos e podem contribuir para a carcinogênese. Dessa forma, ensaios para elucidar este efeito tóxico são requeridos para que as substâncias avancem nos estudos.<sup>3</sup>

Além dos ensaios clássicos requeridos, existem muitas tecnologias relevantes sendo desenvolvidas para a toxicologia e as técnicas para estudos pré-clínicos estão se tornando cada vez mais sofisticadas e complexas. Deste modo, a predição do comportamento tóxico de novas substâncias bioativas está sendo aprimorada e pode aumentar as chances de sucesso destas nas triagens clínicas.<sup>6</sup>

## 2.2 Ensaios celulares

Dentre as diversas ferramentas e métodos aplicados na descoberta de novos fármacos, os ensaios celulares apresentam grande importância por estabelecerem uma conexão entre os estudos enzimáticos e biofísicos (que usam o alvo macromolecular isolado) e os ensaios *in vivo*, que apresentam elevada complexidade devido ao uso de animais.<sup>7</sup> Dessa forma, estes ensaios podem descrever vários aspectos fundamentais para a compreensão da relação entre a substância bioativa e o sistema biológico.<sup>8</sup>

As células utilizadas para estes ensaios devem representar os sistemas biológicos e expressarem os fatores necessários nos processos de sinalização.<sup>9</sup> Para isto, vários tipos e fontes de células são usadas: linhagens imortalizadas, células primárias, linhagens de câncer humano, células-tronco, células-tronco mesenquimais, células-tronco embrionárias e células-tronco pluripotentes. Cada tipo de linhagem possui suas vantagens e desvantagens, no caso das células imortalizadas que são amplamente utilizadas, as vantagens são o baixo custo, fácil crescimento e reprodutibilidade. No entanto, suas características biológicas podem ser alteradas no processo de imortalização e elas podem não responder mais como as células de origem. As linhagens de câncer (um tipo de célula imortalizada) também são amplamente utilizadas para a triagem de substâncias na pesquisa farmacêutica, tanto pela facilidade de manutenção em cultura, quanto para a avaliação de compostos antineoplásicos, porém, essas células podem conter mutações que podem afetar os resultados nos experimentos.<sup>10</sup>

A maioria dos ensaios celulares HTS é feita em placas com múltiplos poços, as quais podem ser miniaturizadas para obter um grande número de poços e aumentar a quantidade de condições testadas em um mesmo experimento.<sup>11</sup> Esses ensaios podem ser feitos utilizando culturas de células 2D convencionais ou culturas tridimensionais.<sup>12</sup> Mais recentemente, o desenvolvimento de dispositivos de microfluídica tem aumentado, permitindo a avaliação dos efeitos das substâncias a longo termo, bem como o estudo das interações entre diferentes tipos celulares em um sistema biológico.<sup>13</sup>

As culturas de células 2D são amplamente utilizadas na triagem e descoberta de novos fármacos devido ao seu baixo custo e facilidade operacional. No entanto, esse modelo de cultura pode apresentar erros na predição de respostas tecido-específicas, que ocorre devido à perda da histologia original e interações limitadas entre as células e com a matriz extracelular.<sup>12</sup> Por outro lado, as culturas 3D geralmente apresentam uma morfologia similar

ao que se é encontrado *in vivo*, incluindo as interações que são ausentes em culturas 2D.<sup>14</sup> Essas diferenças encontradas em cultura 3D fazem com que esse modelo responda diferente à tratamentos com substâncias bioativas, devido à expressão diferenciada de proteínas e cofatores importantes nas vias metabólicas. Dessa forma, culturas 3D são consideradas melhores na avaliação da resposta celular a tratamentos com fármacos. No entanto, ainda existem dificuldades na monitoração dessas respostas usando as técnicas convencionais para detecção da atividade celular.<sup>10</sup>

A utilização de culturas celulares provém muitos pontos toxicológicos para serem detectados, como estresses fisiológicos, genotoxicidade e carcinogenicidade. Existem muitos métodos e protocolos que oferecem abordagens para identificar esses efeitos e mecanismos tóxicos. Embora esses ensaios possuam limitações devido às adaptações das células em cultura, ainda assim fornecem um sistema biológico importante para investigar mecanismos moleculares e vias fisiológicas afetados por substâncias exógenas.<sup>15,16</sup>

## **2.3 Estresse oxidativo**

### **2.3.1 Sistema redox**

A energia necessária para manter a homeostase celular é liberada através dos processos de oxidação, sendo importante na manutenção das estruturas e processos celulares. Essa energia vem da reação de moléculas orgânicas oxidáveis e isso resulta em um ambiente de redução nas células, formado pelos pares redox.<sup>17</sup>

O estado redox intracelular foi primeiramente definido como a taxa de formas oxidadas e reduzidas de pares redox, mas vem sendo utilizado como uma definição geral para o sistema redox celular.<sup>17</sup> Para determinar o sistema redox intracelular seria necessário medir os pares redox presentes nas células, porém seria inviável medir todos os pares. Dessa forma, o par redox GSH/GSSG (glutationa reduzida/glutationa oxidada) pode ser usado como representativo para indicar alterações no sistema redox, visto que esse par representa um grupo muito grande de redutores, sendo considerado um tampão redox.<sup>17,18</sup>

O estado redox é mantido pelo equilíbrio entre a produção de ROS (*Reactive Oxygen Species*) e a ação de enzimas e sistemas antioxidantes não-enzimáticos.<sup>17,19</sup> Quando há um desbalanço entre a produção de ROS e os sistemas antioxidantes, em que a formação dessas espécies é elevada, ocorre o estresse oxidativo,<sup>20</sup> que pode levar a danos celulares devido à instabilidade eletrônica dessas moléculas e sua reatividade com estruturas intracelulares, como lipídeos, proteínas e DNA.<sup>21,22</sup> Esses danos oxidativos podem levar à perda da integridade e funcionalidade celular e acredita-se que podem desempenhar um papel chave no desenvolvimento de doenças, como o câncer, doenças neurodegenerativas, entre outras.<sup>23,19</sup>

### 2.3.2 Espécies reativas de oxigênio

Radicais livres são átomos ou moléculas que contêm número ímpar de elétrons, ou seja, possuem elétrons desemparelhados no último nível eletrônico, tornando-os altamente reativos.<sup>24</sup> O oxigênio em seu estado fundamental ( $O_2$ ) é uma das substâncias mais importantes que geram radicais livres.<sup>25</sup> Porém, o termo “espécies reativas de oxigênio” não inclui somente os radicais livres, mas também átomos e moléculas que não apresentam elétrons desemparelhados na última camada, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )<sup>24</sup> (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Metabólitos de oxigênio (radicais e não radicais).<sup>19</sup>

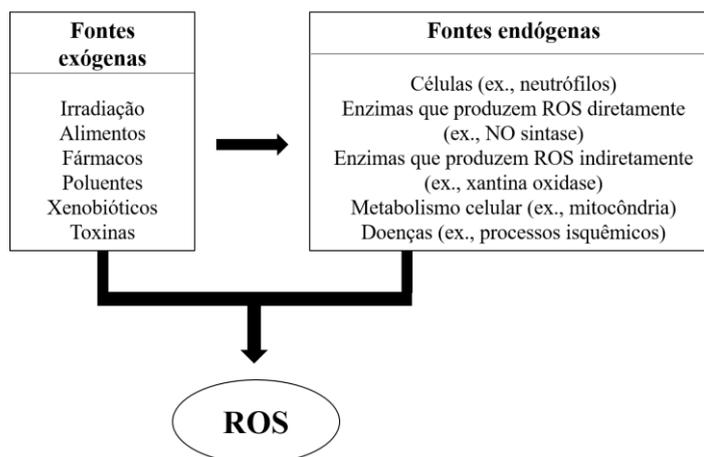
Nome	Símbolo
<b>Radicais de oxigênio</b>	
Oxigênio (bi-radical)	$O_2^{\bullet\bullet}$
Ânion superóxido	$O_2^{\bullet-}$
Hidroxila	$OH^{\bullet}$
Peroxil	$ROO^{\bullet}$
Alcoxil	$RO^{\bullet}$
Óxido nítrico	$NO^{\bullet}$
<b>Derivados de oxigênio (não radicais)</b>	
Peróxido de hidrogênio	$H_2O_2$
Peróxido orgânico	$ROOH$

Ácido hipocloroso	HOCL
Ozônio	O <sub>3</sub>
Aldeídos	HCOR
Oxigênio singlete	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Peroxinitrito	ONOOH

O ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) é considerado a espécie reativa de oxigênio primária e pode interagir com outras moléculas para gerar espécies secundárias.<sup>23</sup> O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é gerado através da redução de um dos átomos de oxigênio. Quando a redução ocorre por meio da superóxido dismutase (SOD) produz o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), respectivamente.<sup>26</sup> O OH<sup>•</sup> apresenta uma alta reatividade, sendo considerada a espécie mais potente em sistemas biológicos e é gerado através das reações de Felton, na presença de um metal de transição, sendo geralmente o ferro (Fe) ou o cobre (Cu), e de Haber-Weiss.<sup>27,28</sup>

As células são expostas a uma grande variedade de ROS, provindas de fontes endógenas e exógenas<sup>19,29</sup> (Figura 1). Uma das principais fontes endógenas de ROS é a cadeia transportadora de elétrons da respiração mitocondrial, onde cerca de 1% a 2% do total de oxigênio consumido é desviado para formar ROS.<sup>30</sup> Das fontes exógenas, uma das principais é através da interação com xenobióticos e fármacos, que geralmente formam ROS como subprodutos de sua metabolização.<sup>19</sup> Devido ao aumento dos níveis de ROS causado por essas fontes, ocorre o acúmulo de danos oxidativos aos componentes celulares, tendo como principais alvos biológicos algumas proteínas, os lipídios de membranas e o DNA.<sup>19,21,22</sup>

Figura 1. Fontes de formação de ROS.



Adaptado de Kohen, R. e Nyska, A., 2002.<sup>19</sup>

Das espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila e o alcóxil são os principais que causam danos às proteínas, podendo ocorrer de forma direta ou indireta. Esses danos incluem peroxidação, danos a resíduos de aminoácidos específicos, alterações em suas estruturas terciárias, degradação e fragmentação. Como consequências a esses danos, podem ocorrer perda de atividade enzimática, alterações em funções celulares, interferência em potenciais de membrana e alterações nos tipos e níveis proteicos da célula.<sup>31,32,33,34</sup>

Os danos aos lipídios são geralmente chamados de peroxidação lipídica e ocorrem em três estágios. O primeiro estágio é chamado de iniciação e envolve o ataque de um metabólito de oxigênio reativo, capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno no lipídio. Em seguida, o radical de ácido graxo restante retém um elétron e é estabilizado pelo rearranjo de sua estrutura molecular. Quando o oxigênio está em concentração insuficiente, o radical de ácido graxo reage com ele formando o radical peróxil (ROO•) durante o estágio de propagação. Esses radicais de ácido graxo podem por si só abstrair outros átomos de hidrogênio de moléculas de ácido graxo próximas. Dessa forma, uma única iniciação pode levar à uma reação em cadeia, resultando na peroxidação de todos os lipídios insaturados presentes na membrana. O último estágio, chamado de terminação, ocorre após a interação de um ROO• com outro radical ou com antioxidantes.<sup>35,19</sup>

Espécies reativas de oxigênio podem interagir com moléculas de DNA, embora estas sejam bem protegidas e estáveis. Essas interações podem causar modificações das bases do

DNA, quebras nas duplas e simples ligações, perda de purinas, danos ao 2-desoxirribose, ligação cruzada com as proteínas do DNA e danos ao sistema de reparo. O radical hidroxila é o mais reativo e pode formar uma variedade de adutos, podendo atacar purinas e pirimidinas levando a formação de diversos produtos. A interação direta do DNA com outras ROS, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, não leva a danos quando ocorre em concentrações fisiológicas. No entanto, essas espécies podem servir como fonte para outros intermediários reativos, como o  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{NO}\cdot$  e  $\text{O}_2\cdot^-$ , que podem facilmente atacar e causar danos ao DNA.<sup>29,36</sup>

Embora o estresse oxidativo esteja associado a todos esses processos que causam danos celulares, ele ainda é essencial para o desenvolvimento e a existência celular.<sup>37</sup> As condições oxidativas em níveis fisiológicos servem como estímulo para processos bioquímicos, tendo um papel chave na ativação de genes,<sup>38</sup> no crescimento e na morte celular,<sup>39</sup> na modulação de diversas reações químicas<sup>40</sup> e é o principal componente do sistema de defesa contra bactérias e vírus.<sup>41</sup> Além disso, ROS são importantes no controle da pressão sanguínea e atuam como mediadores na biossíntese de outras moléculas.<sup>42,43</sup>

### 2.3.3 Sistemas antioxidantes

Devido à contínua exposição a vários tipos de estresse oxidativo, as células desenvolvem mecanismos de defesa para a proteção contra metabólitos reativos. Um sistema de reparo eficiente contra danos oxidativos, consiste em enzimas e pequenas moléculas que podem reparar eficientemente um dano oxidativo em macromoléculas. O sistema de reparo de danos no DNA, por exemplo, pode identificar um aduto de oxidação, removê-lo e adicionar uma base não danificada.<sup>44,45</sup> Além disso, moléculas que podem doar átomos de hidrogênio a moléculas danificadas também são consideradas como parte do sistema de reparo.<sup>46</sup>

O sistema antioxidante é dividido em dois grupos principais, enzimas antioxidantes e antioxidantes de baixa massa molecular. O grupo de antioxidantes enzimáticos é composto principalmente por proteínas como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona peroxidase (GPX) e as peroxirredoxinas (PRDXs), **Figura 2**. Essas enzimas possuem diferentes estruturas, massas moleculares, constantes de reação e são localizadas em diferentes compartimentos celulares, englobando todo o ambiente celular.<sup>47</sup> O grupo antioxidante de baixa massa molecular é composto por vitaminas, hormônios e outras

moléculas pequenas capazes de prevenir danos oxidativos por interação direta e/ou indireta com ROS.<sup>48,49</sup> Esse grupo possui algumas vantagens sobre os antioxidantes enzimáticos, como por exemplo o tamanho menor, que permite que essas moléculas consigam penetrar nas membranas celulares e se localizarem próximas ao alvo biológico.<sup>49</sup>

As enzimas SOD representam a primeira linha de defesa antioxidante enzimática, sendo responsáveis em catalisar a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  a  $O_2$  e  $H_2O_2$  (**Figura 2**).<sup>50</sup> Elas possuem três isoformas, a citoplasmática Cu/ZnSOD (ou SOD-1), a mitocondrial MnSOD (ou SOD-2) e a Cu/ZnSOD (ou SOD-3), que é secretada para o ambiente extracelular.<sup>51</sup> A SOD-1 é a principal isoforma intracelular, sendo responsável por 80% da proteína total. Essas enzimas possuem duas subunidades de 32 kDa e são encontradas principalmente no citosol, mas também podem estar localizadas em outros compartimentos celulares, como na mitocôndria e no núcleo.<sup>52</sup>

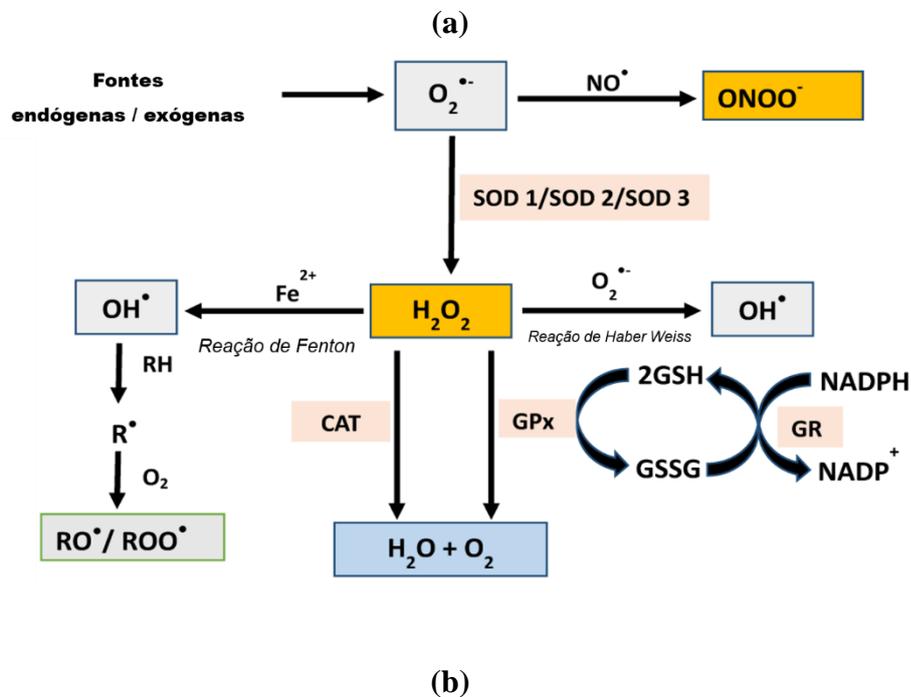
A catalase é uma enzima homotetrâmera constituída por quatro subunidades de 60 kDa. Essa enzima reage eficientemente com o  $H_2O_2$  para formar água e oxigênio molecular, formando juntamente com a GPX, uma linha de defesa contra essa espécie reativa de oxigênio (**Figura 2**). Além disso, a catalase tem um papel importante na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo em resposta adaptativa das células.<sup>53</sup> Essa enzima está localizada principalmente nos peroxissomos, mas também pode ser encontrada na mitocôndria e no núcleo em menores concentrações.<sup>54</sup>

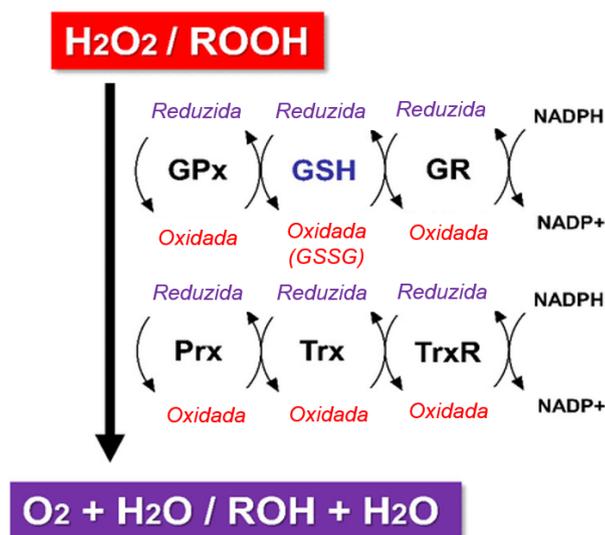
As glutations, assim como a catalase, também convertem o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular e são encontradas principalmente no citosol. Essas enzimas se apresentam em grande parte como glutathiona reduzida (GSH) e uma pequena porção na sua forma oxidada (GSSG), durante estresse oxidativo a GSH é convertida em GSSG pela glutathiona peroxidase (GPX) e é revertida para a forma reduzida através da glutathiona redutase (GR).<sup>55</sup> A GPX catalisa a redução dos hidroperóxidos utilizando a GSH (**Figura 2**) e possui cinco isoformas encontradas em células de mamíferos.<sup>56</sup>

A GPX é a principal isoforma de glutathiona, sendo responsável pela redução de hidroperóxidos de ácido de graxo e do  $H_2O_2$ . Essa enzima é mais expressa no fígado e nos rins, sendo encontrada no citosol e na mitocôndria. Em relação à sua estrutura, é formada por quatro subunidades de 80 kDa, contendo um selenocisteíno em cada uma. O ciclo redox da glutathiona fornece a maior fonte de proteção contra baixos níveis de estresse oxidativo, enquanto que a catalase é a proteção mais significativa contra níveis mais severos.<sup>50,56</sup>

Por fim, as peroxirredoxinas (PRDXs) formam outra classe com papel importante na desintoxicação de peróxidos. Elas pertencem a uma família de enzimas antioxidantes específicas de tiol, que catalisam a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outros tipos de hidroperóxidos na presença de tiorredoxinas ou glutatona.<sup>57</sup> Essa classe de enzimas possui 6 isoformas identificadas em células humanas, que participam na regulação da sinalização celular, influenciando na diferenciação e proliferação das células, em respostas imune e protegendo proteínas sensíveis a radicais livres do dano oxidativo.<sup>58</sup> As PRDX1, PRDX2 e PRDX6 estão localizadas no citosol, enquanto que a PRDX3 encontra-se restrita à mitocôndria, a PRDX5 na mitocôndria e no peroxissomo e a PRDX4 está localizada principalmente no retículo endoplasmático, sendo secretada para o ambiente extracelular.<sup>59</sup>

**Figura 2.** Sistema antioxidante presente na célula: geração e neutralização de espécies reativas de oxigênio (a) e esquema simplificado da integração de enzimas no mecanismo redox (b).





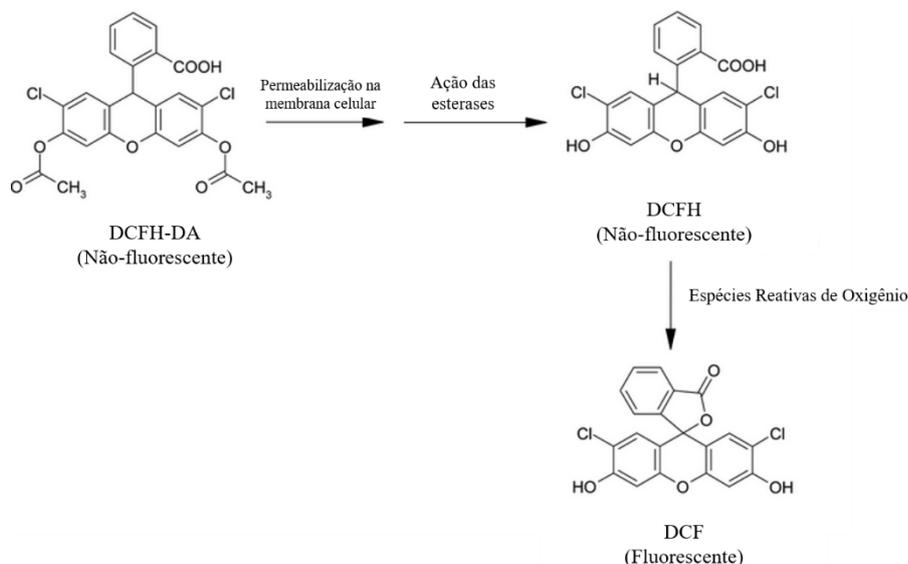
Fonte: Adaptado de (a) Ajuwon, O. R. et al., 2015.<sup>28</sup> (b) Aoyama, K. and Nakaki, T., 2015.<sup>60</sup>

### 2.3.4 Ensaio de detecção de ROS

Muitas abordagens permitem a quantificação e avaliação de ROS em processos bioquímicos. Essas abordagens podem envolver técnicas para quantificar radicais livres, marcadores de dano oxidativo e sistemas antioxidantes, envolvidos no sistema redox celular.<sup>19</sup> Um dos métodos mais utilizados para a quantificação de ROS é através da utilização de marcadores fluorescentes em sistemas biológicos.<sup>61</sup>

O ensaio fluorimétrico utilizando o marcador 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é uma das técnicas utilizadas para quantificar a produção de ROS intracelular.<sup>62</sup> O marcador DCFH-DA pode ser aplicado a estudos celulares devido às suas propriedades de permeabilidade na membrana celular e detecção de fluorescência ativada através da sua oxidação.<sup>63</sup> No ambiente intracelular, o DCFH-DA é hidrolisado enzimaticamente através de esterases, assumindo a forma não-fluorescente DCFH. A presença de peroxidases é importante para a oxidação do DCFH em DCF, sua forma fluorescente (**Figura 3**).<sup>64</sup>

**Figura 3.** Mecanismo proposto para a atividade intracelular do DCFH-DA.



Fonte: Adaptado de Aula, S., et al., 2015.<sup>64</sup>

O DCFH-DA é o marcador fluorescente mais utilizado para detectar  $\text{H}_2\text{O}_2$  e estresse oxidativo, permitindo que os resultados sejam monitorados através de diversas técnicas de fluorescência. No entanto, a química redox intracelular do DCFH é complexa e existem muitas limitações que podem fazer com que o DCF não tenha sempre a mesma eficiência, devido à instabilidade desse marcador.<sup>65</sup> Porém, mesmo com as limitações, o DCFH-DA pode ser utilizado na investigação de mecanismos úteis na sinalização redox.<sup>66,67,68</sup>

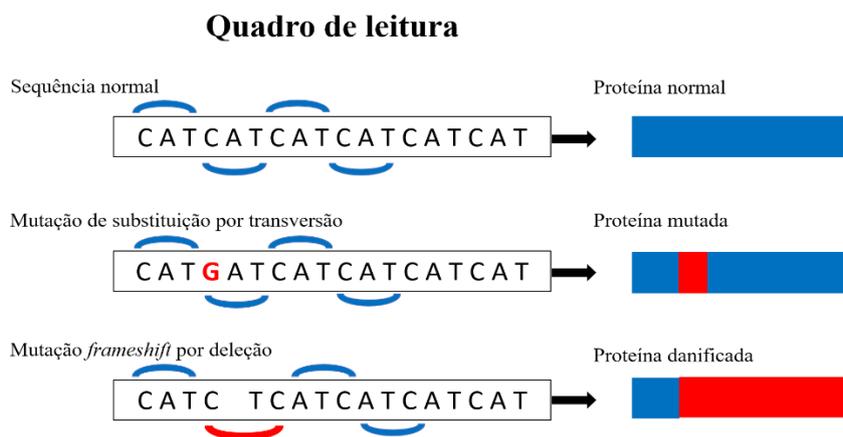
## 2.4 Mutagenicidade

O termo “mutagenicidade” refere-se à alterações na sequência do DNA que causam danos mutagênicos, enquanto que o termo “genotoxicidade” engloba danos mutagênicos e outros danos ao DNA, como a formação de adutos e quebras de fitas.<sup>69</sup> A identificação de mutações ou danos cromossomais é um procedimento importante para garantir a segurança de novas substâncias. Desta forma, a atividade genotóxica pode ser avaliada a partir de diversas técnicas elucidadas na literatura.<sup>70,71</sup>

Mutações são alterações na sequência de nucleotídeos de uma curta região do genoma, em que algumas são pontuais, ocorrendo pela substituição de um nucleotídeo por outro, e

outras envolvem a inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos. As mutações pontuais, também chamadas de mutações de substituição, podem ocorrer por transição, na qual uma purina é substituída por outra purina ou uma pirimidina é substituída por outra pirimidina, ou podem ocorrer por transversão, em que uma purina é substituída por uma pirimidina ou vice-versa. As mutações envolvendo inserções e deleções são chamadas de mutações *frameshift*, pois podem alterar o quadro de leitura do DNA e, quando ocorrem dentro de uma região codificante, interferem na tradução de uma proteína específica.<sup>72,73</sup> A **Figura 4** mostra a diferença entre uma mutação pontual ou de substituição e uma mutação por *frameshift* através da deleção de uma base.

**Figura 4.** Exemplos de mutações por substituição e por *frameshift*.



Fonte: Autoria própria.

Mutações espontâneas e rearranjos dos cromossomos são processos celulares importantes que levam a alterações da estrutura do genoma e agem como ferramentas para a evolução. Essas mutações são ocasionadas por erros na replicação do DNA, nas quais não ocorre a revisão da síntese das novas fitas sintetizadas pela DNA polimerase e um nucleotídeo é inserido erroneamente em um local que não corresponde com seu par de base. Outras mutações ocorrem através da interação de agentes mutagênicos com o DNA, os quais podem alterar a estrutura dos nucleotídeos nas formas citadas no texto acima.<sup>72</sup>

Os efeitos das mutações podem variar muito dependendo do local danificado no genoma e do tipo celular. Muitas mutações não afetam a parte codificante do DNA, sendo consideradas indiretas. No entanto, mutações que modificam o DNA codificante podem alterar o fenótipo a ser produzido, sendo consideradas mais importantes. Além disso,

mutações em células germinativas são mais graves, pois podem transmitir essas alterações para as próximas gerações. A maioria das mutações herdadas não altera o fenótipo do organismo, porém, quando é alterado, pode ocorrer a perda ou ganho de função. As mutações que ocorrem em células somáticas embora não tenham um impacto evolucionário, quando ocorrem sistematicamente, induzindo o mau funcionamento celular, podem induzir o desenvolvimento de tumores.<sup>72</sup>

Devido a esses eventos que danificam o DNA constantemente, é essencial que as células tenham sistemas de reparo eficientes. O reparo do DNA é um processo bioquimicamente complexo, o qual envolve inúmeras proteínas e complexos proteicos que definem as vias de reparo e são responsáveis pela manutenção da integridade do genoma. As vias de reparo podem ser divididas em três tipos: reparo direto, reparo por excisão e reparo recombinacional. O reparo direto possui dois mecanismos principais, que são a fotorreativação, catalisada por enzimas pertencentes à família das fotoliasas/criptocromos, e a reversão de bases alquiladas - catalisadas pelas DNA metiltransferases. O reparo por excisão pode ocorrer por excisão de bases, que ocorre quando uma única base do DNA é alterada, e por excisão de nucleotídeos. O reparo recombinacional é utilizado para lesões de quebras de fita dupla, possuindo duas vias principais, a recombinação homóloga e a junção de extremidades não homólogas, sendo que cada uma dessas vias possui enzimas necessárias únicas. Um composto químico pode levar a alterações deste sistema e de reparo do DNA, tendo efeitos tanto mutagênicos ou antineoplásicos.<sup>74,75,76</sup>

#### **1.4.1 Ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma**

O ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma desenvolvido por Bruce Ames e colaboradores na década de 1970, é um dos estudos realizados até hoje para a detecção de substâncias com atividade mutagênica,<sup>77,78</sup> além de ser aceito pelas principais agências regulatórias.<sup>79,80,81</sup> O teste consiste na reversão de uma mutação no genoma da bactéria *Salmonella typhimurium*, a qual a torna incapaz de produzir histidina, um aminoácido necessário para seu crescimento. No entanto, esta incapacidade em produzir histidina pode ser revertida através de mutações no gene responsável pela síntese desse aminoácido. Dessa forma, uma substância é considerada mutagênica quando há a reversão dessa mutação, promovendo o crescimento bacteriano.<sup>82</sup>

Através desse ensaio é possível identificar substâncias mutagênicas que apresentem uma resposta positiva, induzindo a reversão da mutação na *S. typhimurium* que permite o seu crescimento. No entanto, no caso de resultado negativo, não pode ser descartada a possibilidade de mutagenicidade, devido a possível identificação de substâncias como falso-negativo. Para tornar o ensaio mais sensível, as triagens são realizadas com mais de uma linhagem da bactéria (TA97, TA98, TA100 e TA102), uma vez que as substâncias podem levar a mutações a partir de mecanismos distintos.<sup>82</sup> Além disso, uma fração microssomal (S9) é utilizada para observar se os metabólitos provenientes das substâncias bioativas induzem atividade mutagênica.<sup>83,84</sup>

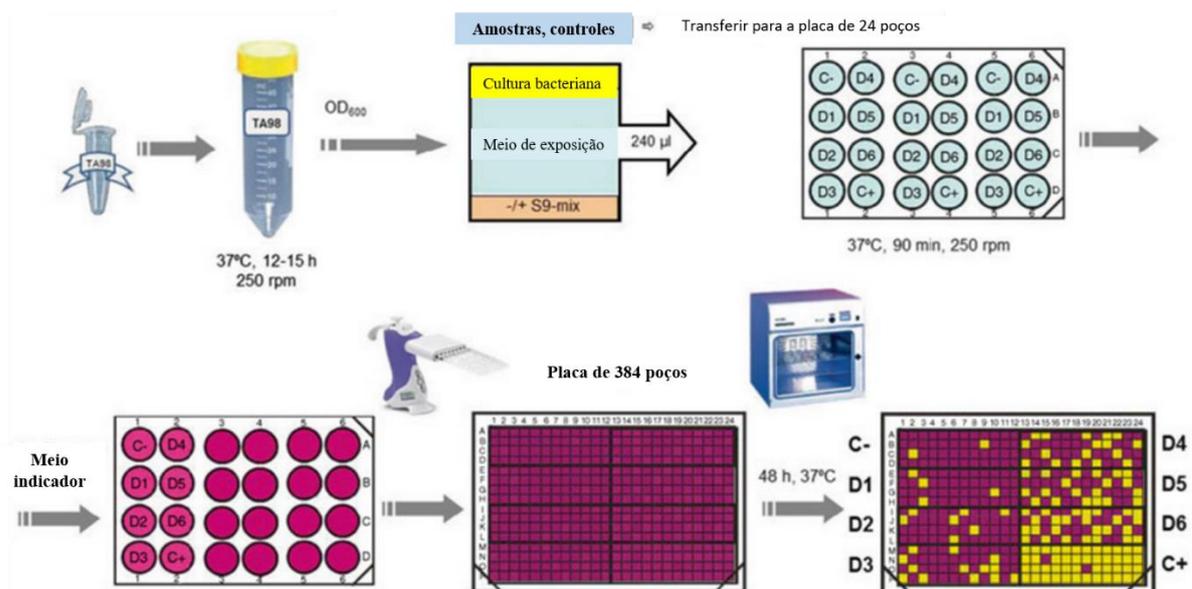
As linhagens de *Salmonella typhimurium* usados para este teste contêm diferentes tipos de mutações no operon da histidina. A linhagem TA98 apresenta mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica a histidinol desidrogenase, enzima responsável pela catálise da fase terminal na biossíntese de histidina, apresentando como ponto preferencial para a reversão, oito resíduos repetitivos de GC, permitindo detectar compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA (*frameshift*). A linhagem TA100 possui a mutação *hisG46* presente no gene *hisG* que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GAG (CTC)- leucina, para o GGG (CCC)- prolina. Assim, essa linhagem detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C. A linhagem TA102 contém a mutação ochre TAA no gene *hisGe*, que detecta eficientemente mutagênicos que causam danos oxidativos e agentes cross-link. Ela apresenta aproximadamente 30 cópias do plasmídeo que confere resistência à tetraciclina e contém o gene mutante *hisG*, determinando seu caráter auxotrófico. Além disto, contém o par de bases A:T no sítio crítico da reversão, detectando uma grande variedade de mutagênicos oxidativos e de agentes *cross-links* que atacam preferencialmente estes pares de base.<sup>82</sup> Outras linhagens de *Salmonella typhimurium* também são utilizadas para aumentar ainda mais a sensibilidade do ensaio. Portanto, para obter resultados mais confiáveis em relação à atividade mutagênica total de um composto, é recomendável a utilização da combinação de várias dessas linhagens.<sup>85</sup>

Além das mutações no operon histidina, essas linhagens possuem mutações adicionais que aumentam a capacidade de detectar agentes mutagênicos. A mutação *rfaΔ* causa perda parcial da barreira lipopolissacarídea que possui na superfície da bactéria, a qual aumenta a permeabilidade de moléculas que não conseguem penetrar na parede celular bacteriana. Outra mutação adicionada é a *uvrB* que é a deleção de um gene que codifica o sistema de reparo do

DNA por excisão, resultando no aumento da sensibilidade de detecção de muitos agentes mutagênicos. Essa mutação se estende também ao gene *bio* e como consequência, essas bactérias também requerem biotina para seu crescimento. Uma terceira mutação adicionada é a pKM101, correspondente ao plasmídeo fator-R, que pode ser revertida por vários mutagênicos que são fracamente detectados sem esse fator, pois ele aumenta a probabilidade de erros no sistema de reparo do DNA. Além disso, a linhagem TA102 contém o plasmídeo pAQ1, o qual possui a mutação *hisG428* e um gene que lhe confere resistência a tetraciclina.<sup>82</sup>

A versão mais sensível desse ensaio consiste no método de pré-incubação, no qual as substâncias testadas são incubadas por 60-90 minutos com as bactérias antes de serem plaqueadas.<sup>86</sup> O ensaio tradicional é realizado em placas de petri usando meio ágar, em que ao final do tempo de incubação as colônias revertentes são contadas.<sup>87</sup> Porém, a nova versão para esse teste, chamada Ames II, consiste em uma técnica de flutuação em placas multi-poços, a qual utiliza um meio indicador de pH que altera a coloração dos poços revertentes indicando alto metabolismo celular.<sup>88</sup> Esta versão permite a avaliação em HTS, pois necessita poucas quantidades das substâncias testadas e é realizada em placas de 384 poços, onde ao final do tempo de incubação, os poços revertentes são contados (**Figura 5**).<sup>89</sup>

**Figura 5.** Protocolo do teste de flutuação em placas multi-poços.



Fonte: Adaptado de Flückiger-Isler, S. e Kamber, M., 2014.<sup>90</sup>

Os resultados desse ensaio são analisados através da comparação das substâncias testadas com o controle negativo, que consiste nas bactérias sem tratamento, contendo apenas o solvente utilizado. Para aumentar a sensibilidade do ensaio, são utilizados controles positivos para cada linhagem de *Salmonella typhimurium*, que são compostos conhecidos por ter alta atividade mutagênica para estas bactérias.<sup>87</sup> Os resultados positivos são geralmente investigados por outros ensaios de mutagenicidade, incluindo ensaios com células de mamíferos, pois nem todas as substâncias que apresentam resultados positivos nesse ensaio, são necessariamente prejudiciais a humanos. Os resultados negativos também devem ser confirmados por outros ensaios, visto que podem existir falsos-negativos. Essas diferenças que podem ser encontradas nos resultados são geralmente devido às diferenças celulares, como os processos do metabolismo e reparo do DNA e as diferenças entre a fração microsomal S9 de ratos e humanos, visto que a de ratos é mais comumente utilizada.<sup>91</sup> No entanto, o ensaio Ames vem sendo descrito como uma técnica eficaz na detecção de agentes mutagênicos e carcinógenos, sendo aconselhada para a avaliação de novas substâncias.<sup>92,93,94,95</sup>

## 1.5 Substâncias em estudo

### 1.5.1 Inibidores de cisteíno proteases e da via PI3K/AKT/mTOR

O Grupo NEQUIMED, lotado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQSC-USP), atua no planejamento, síntese e avaliação de novas substâncias com potencial efeito antiparasitário e antineoplásico. Parte dessas substâncias atuam como inibidores de cisteíno proteases, com descrição de atividade inibitória em catepsina L e cruzafina,<sup>96,97</sup> enquanto outras agem como inibidores da via PI3K/AKT/mTOR.<sup>98</sup>

Catepsinas são endopeptidases lisossomais que estão envolvidas na degradação terminal de proteínas. Estudos mostram que essas proteases têm um papel importante no desenvolvimento de tumores, devido a sua expressão e atividade enzimática estarem aumentadas em tecidos tumorais e à relação delas em processos de invasão e metástase.<sup>99</sup> A cruzafina, por sua vez, é uma enzima importante para o *Trypanosoma cruzi*, agente causador

da doença de chagas, sendo expressa durante todas as suas formas evolutivas.<sup>100</sup> Estudos sugerem que essa enzima participa dos processos de adesão e invasão do parasita em células do sistema imune, os quais são mecanismos importantes no processo de infecção.<sup>101</sup> Além disso, ela também pode contribuir para a manutenção da parasitologia no tecido cardíaco durante a fase crônica da doença.<sup>102</sup>

A outra classe de substâncias estudadas foi inicialmente desenvolvida por um dos coordenadores do grupo de pesquisa, o Prof. Dr. Andrei Leitão, que realizou um estudo *in silico* no qual foram identificadas novas substâncias que atuam como inibidores competitivos ao ATP na via PI3K-AKT-mTOR.<sup>98</sup> A mTOR é uma serina/treonina quinase com massa de 289 kDA, presente em quase todas as células e frequentemente abordada como alvo terapêutico para o câncer. Essa quinase é parte de uma rota bioquímica que integra sinais celulares e extracelulares e serve como regulador central do metabolismo, crescimento e proliferação celular. Descobertas dos últimos anos mostram que essa via está desregulada em vários processos patogênicos, incluindo o câncer e diabetes tipo II.<sup>103,104</sup>

Devido ao envolvimento desses alvos no desenvolvimento de tumores e na doença de chagas, fica evidente a importância de estudos com esses novos inibidores. Muitas técnicas vêm sendo desenvolvidas no Grupo NEQUIMED afim de elucidar as propriedades químicas e biológicas dessas substâncias, bem como seus efeitos contra os fatores envolvidos nessas doenças. Porém, para esses inibidores avançarem no processo de desenvolvimento de fármacos, ainda faltam etapas importantes, como a investigação dos seus efeitos tóxicos.

### **1.5.3 Substâncias de referência**

#### *1.5.3.4 Benzonidazol*

Atualmente, o benzonidazol é o único fármaco disponível no Brasil para o tratamento da doença de chagas.<sup>105</sup> Este fármaco compõem a classe nitroaromática e estudos sugerem que seu principal mecanismo de ação consiste na geração de radicais livres e ROS que se ligam covalentemente à macromoléculas vitais ao *Trypanosoma cruzi*, parasita responsável pela doença, e promovem danos oxidativos.<sup>106,107,108</sup>

O benzonidazol possui uma boa eficácia na fase aguda da doença, porém, a mesma resposta não é encontrada na fase crônica, devido à sua complexidade envolvendo mecanismos imunológicos, bem como a resistência do parasita.<sup>109</sup> Além disso, seu tratamento leva à diversos efeitos colaterais que estão relacionados com a atividade enzimática de nitroredução.<sup>110</sup> Em células de mamíferos, o grupo nitro (NO<sub>2</sub>) presente em sua estrutura é reduzido a um grupamento amino (NH<sub>2</sub>) por enzimas do tipo nitroredutase presentes nessas células hospedeiras, levando à formação de radicais intermediários e ROS. Essa redução enzimática é responsável por modificações covalentes em macromoléculas dessas células, em processos mediados por redutases presentes no citocromo P450.<sup>108</sup>

A seletividade farmacológica do benzonidazol ao *T. cruzi* se atribui ao fato de que as células de mamíferos possuem um melhor mecanismo antioxidante, quando comparado às células do parasito.<sup>108</sup> No entanto, este fármaco apresenta alta toxicidade nas células hospedeiras, indicando que mesmo com um sistema antioxidante mais completo, este ainda não é suficiente na proteção contra benzonidazol. A sua biotransformação pelas enzimas hepáticas mostra ter alta relação com alterações na funcionalidade mitocondrial a qual pode estar ligada à sua natureza tóxica no fígado.<sup>111</sup> Além disso, seus efeitos adversos incluem reações de hipersensibilidade, alterações dermatológicas graves e danos neurológicos periféricos,<sup>112</sup> e em decorrência da interação de ROS com o DNA, foi demonstrada atividade mutagênica<sup>113,114</sup> e correlação com tumores malignos em estudos *in vivo*.<sup>115,116</sup>

#### 1.5.3.5 Doxorubicina

A doxorubicina é um agente antitumoral amplamente utilizado que pertence à classe de compostos com estrutura similar, denominados antraciclinas. Este composto tem mostrado grande eficácia na morte de células tumorais em tumores líquidos e sólidos. No entanto, seu uso tem sido limitado devido à resistência adquirida em alguns casos e efeitos colaterais. O mecanismo pelo qual a doxorubicina leva a morte celular ainda não é claro, sendo que alguns modelos já foram propostos, incluindo a superprodução de ceramida, formação de adutos de DNA, estresse oxidativo e inibição da topoisomerase II.<sup>117</sup>

O maior efeito colateral observado com o tratamento de doxorubicina é a cardiomiopatia, causando danos às células que não estão se dividindo, nas quais a TOPII $\beta$  é a forma mais presente. Já foi demonstrado que a depleção desse subtipo de topoisomerase protege ratos deste efeito colateral. Como a maioria dos fármacos antitumorais desenvolvidas são efetivas apenas em células crescendo de forma exponencial, a presença de células em

diferentes fases do ciclo celular e dentro do mesmo tumor é um grande desafio ao tratamento.<sup>118</sup>

Estudos mostram que a cardiotoxicidade gerada por doxorubicina está relacionada com o estresse oxidativo nessas células, devido ao aumento nos níveis de ROS que induz peroxidação lipídica, juntamente com a deterioração miofibrilar e a desregulação do cálcio intracelular.<sup>119</sup> É bem descrito que o ânion superóxido é gerado durante o ciclo redox de antraciclinas e convertido em radical hidroxila ou peroxinitrito, ambos oxidantes fortes e que podem induzir danos celulares.<sup>120</sup> Outros estudos demonstram que além da cardiotoxicidade a doxorubicina induz danos genotóxicos, como mutações e aberrações cromossômicas, nos quais o estresse oxidativo tem um papel importante.<sup>121,122,123</sup> Além disso, há uma diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante nas células cardíacas, promovendo juntamente com o aumento nos níveis de ROS, o desenvolvimento e progressão da cardiotoxicidade.<sup>124</sup>

## **2 OBJETIVOS**

---

Neste trabalho foram avaliadas as propriedades mutagênicas e de estresse oxidativo desencadeadas por substâncias em estudo no Grupo NEQUIMED, com avaliação comparativa aos fármacos benzonidazol e doxorubicina.

Para isso, alguns objetivos específicos foram estabelecidos, incluindo:

- Padronização da técnica de detecção de ROS utilizando o marcador fluorescente DCFH-DA nas linhagens celulares HepG2 e Balb/C (fibroblastos);
- Avaliação das substâncias pela técnica de detecção de ROS;

- Avaliação do sistema antioxidante enzimático após tratamento com as substâncias em células HepG2;

- Padronização do ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma para as linhagens TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*.

- Avaliação da atividade mutagênica por dano oxidativo utilizando a linhagem de *S. typhimurium* TA102.



## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3.1 Detecção de ROS

#### 3.1.1 Materiais e Reagentes

O marcador fluorogênico DCFH-DA (diacetato de dicloro-dihidro fluoresceína), o dimetilsulfóxido (DMSO) e a substância de referência benzonidazol foram comprados da empresa Sigma-Aldrich®. A substância doxorubicina foi obtida da Selleckchem LLC, EUA. O PBS e o sachê do meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sem vermelho fenol são da marca Cultilab®. FBS e tripsina foram adquiridos da empresa Vitrocell®. A solução de peróxido de hidrogênio (mínimo 29%, Synth) e outros reagentes foram de grau analítico.

#### 3.1.2 Linhagens celulares

As linhagens celulares Balb/C 3T3 clone A31 (fibroblastos de camundongo) e a HepG2 (carcinoma hepatocelular) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas células foram mantidas em frascos de cultura T75 a 37°C, 90% de umidade em 5% CO<sub>2</sub>, até atingirem a confluência de trabalho em meio DMEM pH 7,2 (±0,2). Para a manutenção das células, após cada período de cultura efetivou-se uma nova passagem de frascos, com troca de meio de cultura a cada 48 horas.

#### 3.1.3 Padronização do ensaio de detecção de ROS

##### 3.1.3.1 Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento de experimentos com composto central previamente estabelecido no grupo NEQUIMED pela Dra. Patrícia L. S. Bergo. Assim, os fatores determinados como relevantes para o ensaio foram as concentrações do marcador DCFH-DA e da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, além do tempo de incubação do marcador fluorogênico. Em seguida, determinou-se os limites máximos e mínimos da variação dos fatores e subdividiu-se estes em

uma faixa com variação de 5 pontos, incluindo os limites de máximo e mínimo. Portanto, foram determinadas as variações dos fatores relevantes ao ensaio (**Tabela 2**), com três parâmetros avaliados (concentração de DCFH-DA, tempo de incubação e concentração de  $H_2O_2$ ) usando o controle positivo (linhagem celular, solução de DCFH-DA em PBS e solução de  $H_2O_2$  em PBS) e o controle negativo (linhagem celular e solução de DCFH-DA em PBS para obter a produção natural de ROS pelas células).

A partir do planejamento experimental, foram realizados três ensaios independentes ( $n=9$ ). Primeiramente, as células em cultivo no meio DMEM foram adicionadas em placas de 96 poços na concentração final de  $1 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$  e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$  em 90% de humidade por 24 horas, a fim de que as células estivessem aderidas à superfície dos poços. O meio de cultura foi então retirado, os poços foram lavados com PBS e 100  $\mu\text{L}$  das soluções com diferentes concentrações pré-estabelecidas do marcador DCFH-DA foram adicionadas aos poços. Em seguida, após diferentes tempos de incubação, o meio contendo o marcador DCFH-DA extracelular foi retirado, os poços foram lavados 1 vez com PBS, e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  das soluções de  $H_2O_2$  aos poços de interesse. A quantificação foi realizada a partir da emissão imediata de fluorescência medida através do fluorímetro Biotek Synergy HT ( $\lambda_{\text{exc}}=485/20/40$  e  $\lambda_{\text{emis}}=532/40$ ).

**Tabela 2.** Variáveis usadas para a padronização da detecção de ROS. Três fatores foram considerados: Tempo de incubação ( $t_{\text{DCFH-DA}}$ ), concentração do marcador DCFH-DA ( $[\text{DCFH-DA}]$ ) e a concentração do peróxido de hidrogênio ( $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ). Como controle negativo foram utilizadas as células sem tratamento com  $H_2O_2$ .

Ensaio	$t_{\text{DCFH-DA}}$ (min)	$[\text{DCFH-DA}]$ ( $\mu\text{M}$ )	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ ( $\mu\text{M}$ )
1	15	500	250
2	25	250	150
3	25	250	350
4	25	750	150
5	25	750	350
6	35	1	250

7	35	999	250
8	35	500	50
9	35	500	450
10	35	500	250
11	45	250	150
12	45	250	350
13	45	750	150
14	45	750	350
15	55	500	250

---

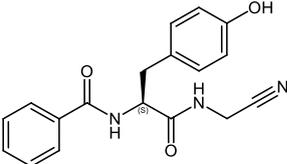
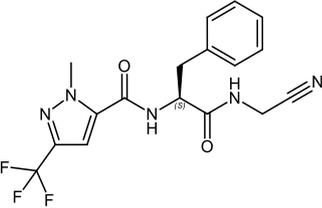
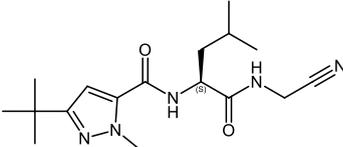
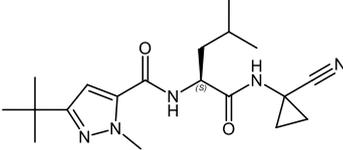
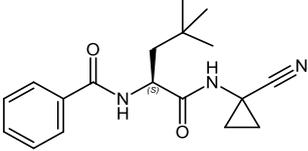
### *3.1.3.2 Detecção de ROS induzida pelas substâncias de referência*

A detecção de ROS gerada pelas substâncias benzonidazol e doxorrubicina foi quantificada. As células de fibroblastos e HepG2 foram cultivadas e plaqueadas em condições-padrão e, em seguida, o meio de cultura dos poços foi retirado e as células foram tratadas com as substâncias. Foram utilizadas as concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  para o benzonidazol e 10 e 100 nM para doxorrubicina, concentrações que não apresentam efeito citotóxico nas linhagens utilizadas. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi retirado, os poços foram lavados com PBS e o ensaio para detecção de ROS foi feito nas condições descritas para o ensaio de padronização. Como controle negativo foram utilizadas as linhagens celulares sem tratamento e como controle positivo as células tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração de 500  $\mu\text{M}$ .

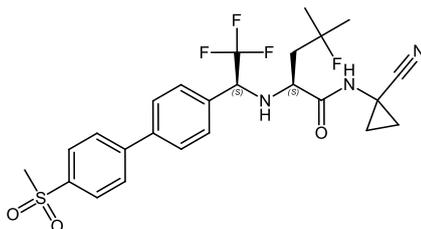
### 3.1.4 Triagem das substâncias em estudo

Foram selecionadas 15 substâncias em estudo pelo grupo NEQUIMED, dentre elas inibidores de cisteíno proteases e inibidores da mTOR (**Tabela 3**), com potenciais atividades antineoplásicas e antiparasitárias. Essas substâncias foram testadas nas condições pré-estabelecidas para o ensaio de detecção de ROS nas células de fibroblastos e HepG2. As linhagens celulares foram tratadas com concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  das substâncias, por 24 horas, e as substâncias de referência foram utilizadas no ensaio como controles positivos, juntamente com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A partir dessa triagem inicial, duas substâncias foram selecionadas para os próximos ensaios celulares.

**Tabela 3.** Descrição das substâncias utilizadas para o ensaio de detecção de ROS.

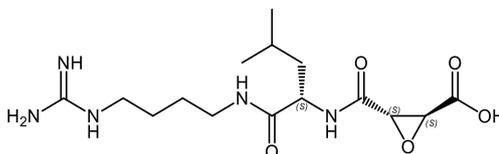
Substâncias	Estrutura	Mecanismo de ação
Neq0551		Inibidor de cisteíno proteases
Neq0554		Inibidor de cisteíno proteases
Neq0568		Inibidor de cisteíno proteases
Neq0569		Inibidor de cisteíno proteases
Neq0573		Inibidor de cisteíno proteases

Neq0587  
(odanacatib)



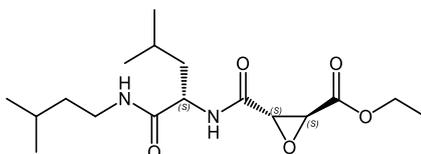
Inibidor de cisteíno proteases  
(referência)

E64



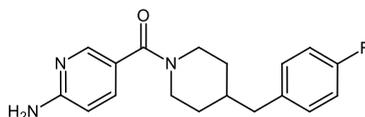
Inibidor de cisteíno proteases  
(referência)

E64d



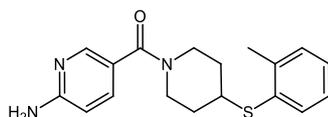
Inibidor de cisteíno proteases  
(referência)

Neq0438



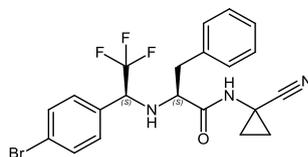
Inibidor da via PI3K/AKT/mTOR

Neq0440



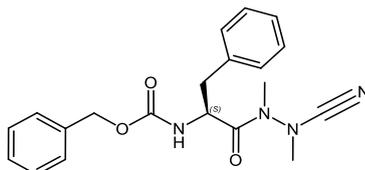
Inibidor da via PI3K/AKT/mTOR

Neq0636



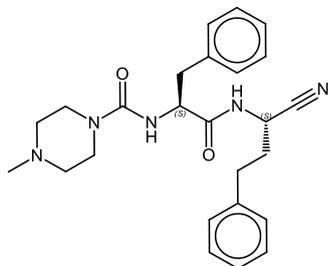
Inibidor de cisteíno protease

Neq0677



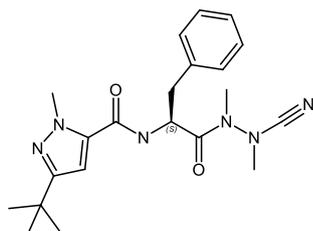
Inibidor de cisteíno protease

Neq0682



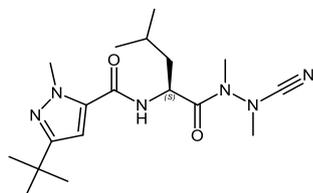
Inibidor de cisteíno protease

Neq0689



Inibidor de cisteíno protease

Neq0690



Inibidor de cisteíno protease

### 3.1.5 Detecção de ROS em curta e longa exposição aos tratamentos

O ensaio de detecção de ROS em curta e longa exposição aos tratamentos foi realizado com as substâncias Neq0438, Neq0551 e com os padrões doxorrubicina e benzonidazol na linhagem celular HepG2. As células foram cultivadas nas condições-padrão e tratadas durante 6, 24 e 48 horas, com concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  das substâncias, com exceção da doxorrubicina que foi utilizada em 1 e 0,1  $\mu\text{M}$ . Após os tempos de incubação a detecção de ROS foi realizada.

### 3.1.6 Detecção de ROS em esferoides de HepG2

O ensaio de detecção de ROS também foi realizado em cultura 3D que foi pré-estabelecida no grupo utilizando esferoides da linhagem HepG2. Os esferoides foram formados através da técnica de flutuação forçada, utilizando placas de 96 poços com fundo redondo e de baixa aderência (Costar ultra low attachment (ULA)). Foram plaqueadas 2.000 células/poço, que foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos, a fim de que as células formassem um aglomerado e, posteriormente, esferoides. Após três dias de cultura, os esferoides foram tratados com as substâncias nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  para Neq0438, Neq0551 e benzonidazol; 1 e 0,1  $\mu\text{M}$  para doxorrubicina. Depois de 24 e 48 horas a detecção de ROS foi feita utilizando o mesmo protocolo e controles estabelecidos para a cultura bidimensional.

## 3.2 Avaliação do sistema antioxidante enzimático

### 3.2.1 Materiais e reagentes

Os reagentes utilizados para o qRT-PCR foram, clorofórmio, isopropanol, trizol, kit de DNase, Kit High Capacity e SYBR green adquiridos da Thermo Fisher Scientific e as sequências iniciadoras (*primers*) da Exxtend. Para o Western blot os reagentes foram, inibidor de protease (7X Ompelet Tablets mini EDTA) da marca Roche, o NP-40 e NEM (N-etilmaleimida), adquiridos da Sigma-Aldrich®, as membranas de nitrocelulose da Bio-Rad, os anticorpos para catalase e PRDX1 da Cell Signalling, para PRDX2-6 da Abnova e para SOD1 da Thermo Fisher Scientific.

### 3.2.2 Estudo da expressão gênica (qRT-PCR)

Para verificar os níveis de expressão das principais enzimas que compõem o sistema antioxidante, foi realizado o ensaio qRT-PCR em parceria com o Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada, na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) com supervisão da Me. Carla Peres de Paula. As células HepG2 foram tratadas em frascos de cultura T25 com as substâncias Neq0438, Neq0551 e benzonidazol na concentração de 10  $\mu$ M, enquanto que para a doxorrubicina foi usado 0,1  $\mu$ M, com incubação por 6, 24 e 48 h. Após cada período de tratamento as amostras foram ressuspensas em 1 mL de trizol e congeladas a -80 °C para posterior extração de RNA. Para isso, a mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos e posteriormente foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>). Após agitação a amostra foi incubada por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugada por 15 minutos a 12.000 g em temperatura de 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500  $\mu$ L de isopropanol gelado. Após homogeneização, foi realizado nova incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 minutos a 15.000 g à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionado 1 mL de etanol gelado a 75%, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 15.000 g à 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura

ambiente, sendo então ressuspenso em água livre de RNase incubado a 55°C por 10 minutos e posteriormente colocado em gelo para solubilização total do RNA.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA) e a concentração das amostras foi ajustada para  $\cong$  900 ng/ $\mu$ L e posteriormente avaliadas quanto à integridade em gel desnaturante de agarose. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

Para retirar possíveis contaminações do RNA com moléculas de DNA, 1,0 $\mu$ g de cada RNA extraído foi tratado com 1,0  $\mu$ L da enzima *DNAseI* (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 1,0  $\mu$ L *DNAseI reaction buffer* com MgCl<sub>2</sub> 10X (Tris-HCl pH 8.4 200mM, MgCl<sub>2</sub> 20mM, KCl 500mM), num volume final de 10  $\mu$ L. A reação foi incubada por 30 min à temperatura de 37°C e paralisada com a adição de 1,0  $\mu$ L de EDTA 50mM e incubação por 10 min a 65°C.

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA tratado com *DNAseI*, através da reação de transcrição reversa, usando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). À amostra de RNA tratada, foi adicionado 2,0  $\mu$ L de 10X RT Buffer, 0,8  $\mu$ L de 25X dNTP Mix (100 mM), 2,0  $\mu$ L de 10X RT Random Primers, 1,0  $\mu$ L de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de RNase Inhibitor, 3,2  $\mu$ L de Nuclease-free H<sub>2</sub>O. A síntese de cDNA foi feita a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos. A reação foi paralisada através de incubação a 85°C por 5 minutos. Para verificar a eficiência da reação da transcriptase reversa em sintetizar moléculas de cDNA foi realizada uma amplificação por qRT-PCR utilizando iniciadores para o gene endógeno beta actina (BAC). A amplificação adequada deste gene indica uma boa síntese de cDNA.

A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) onde foi utilizado o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), que emite sinal de fluorescência ao intercalar com DNA dupla-fita. Os *primers* foram desenhados no programa online OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA), analisados quanto a formação de estruturas como *hairpins* e *dimers* e submetidos ao programa Blast

([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) para confirmação de especificidade. Como controle endógeno utilizou-se *primers* para amplificação do gene da beta actina (BAC). Em todos os casos foram feitos controles negativos, com água estéril substituindo a amostra. As amostras foram amplificadas em duplicatas. As reações foram preparadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa usado foi: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Após a amplificação, a curva de melting foi determinada, através da variação de temperatura de 95°C por 15s, 60°C por 1 min e novamente 95°C por 15s. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados no Anexo B.

A quantificação dos resultados se baseia na derivação da fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .<sup>125</sup> As amostras estudadas tiveram a expressão relativa determinada. Os dados de Ct foram exportados para uma planilha no programa *Excel* (Microsoft Corporation) e, então, analisados. O  $\Delta Ct$  foi calculado utilizando as diferenças na média de Ct entre os genes alvos e seus controles endógenos. Após, o  $\Delta\Delta Ct$  foi calculado em relação a uma situação considerada como referência, que constitui a amostra calibradora. Em seguida, procede-se calculando o  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .<sup>125</sup>

### 3.2.3 Quantificação do conteúdo proteico intracelular (Western blot)

O Western blot também foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada - UFSCAR, sob a supervisão da Me. Karina Lopes Teixeira, para a quantificação das principais enzimas antioxidantes presentes nas amostras. Os tratamentos com as substâncias Neq0438, Neq0551, benzonidazol e doxorrubicina foram descritos no ensaio anterior. As amostras foram congeladas em PBS contendo inibidor de protease 7X (Ompelet Tablets mini EDTA) e NEM a 200 mM. Para a extração de proteínas foi utilizado uma solução de NP-40, contendo NaCl (150 mM), Tris-HCl (60 mM), NEM (20 mM) e NP-40 (1 %), e a quantificação foi feita pelo método de Lowry. A concentração de 20 µg de proteínas foi padronizada para cada amostra, que foram então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % e tampão Tris-glicina. As amostras foram transferidas para as membranas de nitrocelulose e foram incubadas com leite em pó desnatado a 9 % (Molico) durante 3 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS/T e incubadas *overnight* com o anticorpo primário (**Tabela 4**). Após a incubação, as membranas foram lavadas novamente com TBS/T e incubadas com o anticorpo secundário

durante 2 horas. Ao final, as membranas foram lavadas com TBS/T, foi adicionada a solução reveladora ECL Prime (GE Healthcare) e as membranas foram reveladas utilizando o ChemiDoc (Bio-Rad). Os resultados foram analisados no Software Image J.

**Tabela 4.** Descrição dos anticorpos utilizados para o Western blot.

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Anticorpo secundário</b>
GAPDH	1:4000	Coelho
Catalase	1:4000	Coelho
SOD1	1:3000	Coelho
PRDX1	1:3000	Camundongo
PRDX2	1:300	Camundongo
PRDX5	1:3000	Camundongo
PRDX6	1:3000	Camundongo

### 3.3 Ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma

#### 3.3.1 Materiais e reagentes

Para o ensaio de mutagenicidade a ampicilina foi adquirida da Sigma-Aldrich®, o mix S9, os compostos controles (2-nitrofluoreno (2-NF), *N*-óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) e o 2-aminoantraceno (2-AA)) e o kit com os meios de cultura foram da BioReliance® - Moltex.

#### 3.3.2 Linhagens de *Salmonella typhimurium*

As linhagens TA98, TA100 e TA102 são da marca Molecular Toxicology, Inc. (Moltex®) e foram armazenadas a 2-8°C antes de serem utilizadas. A **Tabela 5** sumariza as características das linhagens.

**Tabela 5.** Características genóticas e fenotípicas das linhagens de *Salmonella typhimurium*.<sup>82</sup>

<b>Linhagens</b>	<b>Mutações His</b>	<b>Plasmídeos</b>	<b>Outras mutações</b>	<b>Tipo de mutação detectável</b>
TA98	hisD3052	pKM101	rfaΔ(uvrBchlbio)	<i>Frameshift</i> Deleção GC
TA100	hisG46	pKM101	rfaΔ(uvrBchlbio)	Substituição GC para AT
TA102	pAQ1 (hisG428)	pKM101	rfa	Substituição AT para GC

Onde: **rfaΔ**: Esta mutação leva à perda parcial da camada de lipopolissacarídeos da parede bacteriana (LPS), tornando a célula mais permeável a diferentes moléculas. **uvrB**: A deleção do gene *uvrB* elimina o mecanismo de reparo por excisão livre de erro (*error free*). A deleção se estende até o gene responsável pela síntese da biotina, tornando as linhagens dependentes de biotina. **pKM101**: Este plasmídeo R contém um gene que causa aumento no sistema de reparo passível de erro (*error prone*). O plasmídeo tem a resistência a ampicilina como marcador.

### 3.3.4 Avaliação da eficácia dos controles

A eficácia dos controles do ensaio foi verificada em três linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA100 e TA102). Um disco de cada linhagem foi adicionado em 5 mL de meio de crescimento com 50 µL de ampicilina (25 µg/mL), seguindo de incubação a 37°C sob agitação de 7 g por 17-18 horas, até atingirem a densidade ótica mínima de 2,0, que foi medida no espectrofotômetro DeNovix em  $\lambda = 600$  nm. Para a pré-incubação com as substâncias controles, as linhagens foram diluídas em meio de exposição e foram transferidas para placas de 24 poços contendo 240 µL de meio de exposição com as bactérias e 10 µL da substância testada por poço. As bactérias foram então pré-incubadas por 90 minutos a 37°C sob agitação a 7 g. Como controle positivo sem ativação metabólica foram usados: (i) 2-nitrofluoreno (2-NF) e *N*-óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) para as linhagens TA98 e TA100; (ii) somente 4-NQO para a linhagem TA102. O controle positivo com ativação metabólica foi composto por 2-aminoantraceno (2-AA), juntamente com o mix S9 contendo a fração microsomal S9. Como controle negativo foram utilizadas as linhagens sem tratamento com as substâncias para verificar a reversão espontânea das mutações. Após a pré-incubação, foram adicionados 2,8 mL de meio indicador em cada poço da placa de 24 poços. O conteúdo de cada poço foi então transferido para 48 poços de uma placa de 384 cavidades, que foi incubada por 48 horas a 37°C. Ao final do tempo de incubação, os poços que reverteram as mutações passaram a ter a coloração amarela e foram contados.

### 3.3.5 Avaliação das substâncias em estudo

As substâncias Neq0438, Neq0551, doxorubicina e benzonidazol foram avaliadas pelo ensaio *Salmonella typhimurium*/microsoma utilizando os controles e as condições pré-estabelecidas para o ensaio. Foram utilizadas seis concentrações para cada substância, sendo 100  $\mu\text{M}$  a maior concentração, seguida de uma diluição seriada para as substâncias Neq0438, Neq0551 e benzonidazol. No caso da doxorubicina, a maior concentração usada foi 10  $\mu\text{M}$ .

## 3.4 Análises estatísticas

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicatas com  $N=3$  para os ensaios de padronização, e em duplicatas com  $N=3$  para os ensaios de detecção de ROS e o ensaio Ames. Os dados foram tratados no Software Microsoft Excel 2013 e os valores de desvio padrão (DP) são apresentados. Estudos estatísticos de variância de médias (Teste ANOVA) foram realizados utilizando o Software GraphPad Prism 6.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 Detecção de ROS

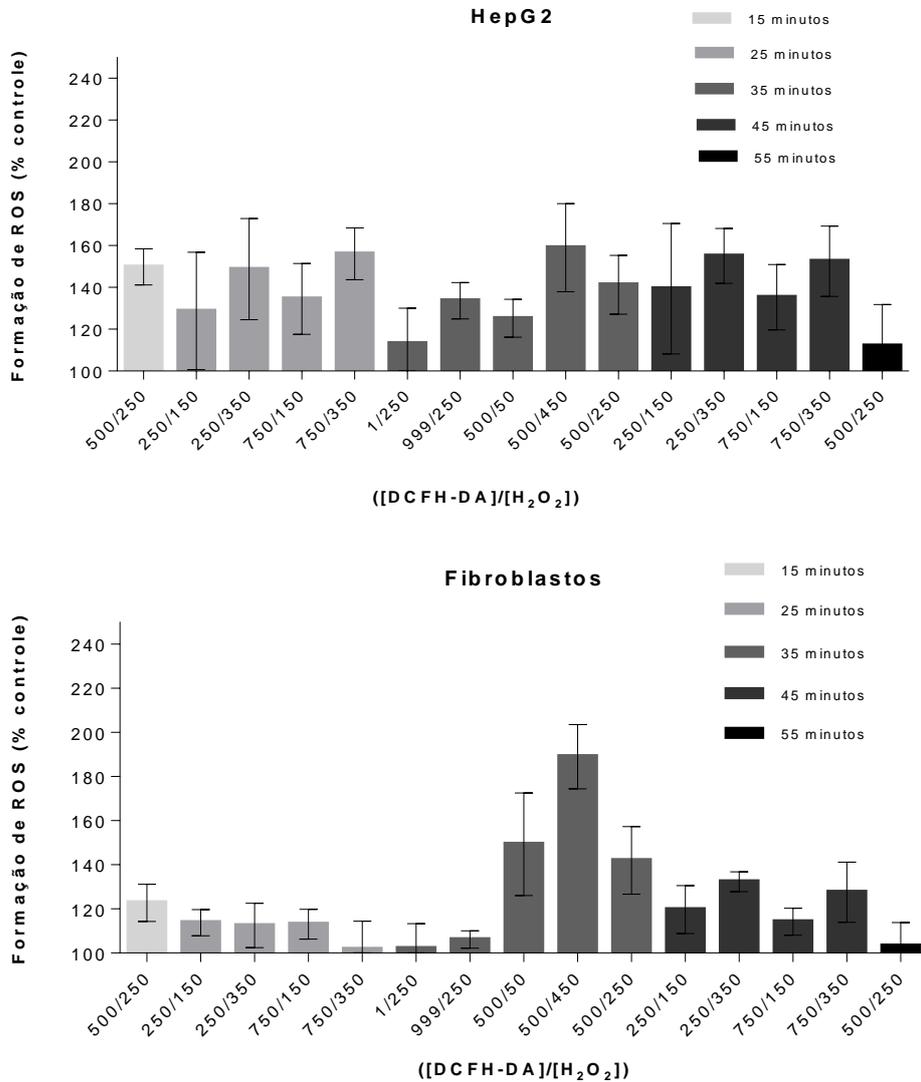
#### 4.1.1 Padronização do ensaio de detecção de ROS

##### 4.1.1.1 Planejamento experimental

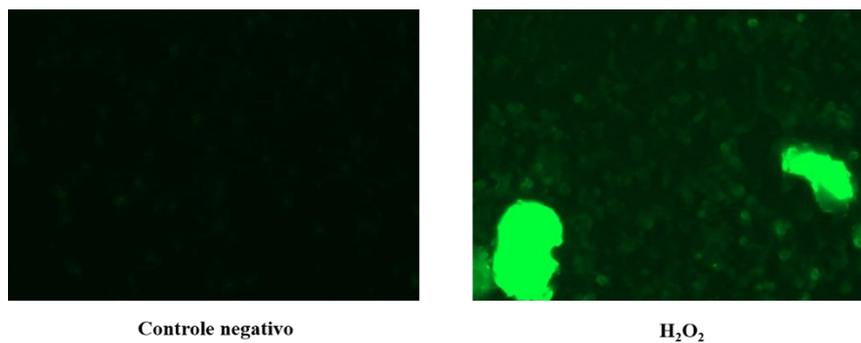
Foram avaliadas as combinações dos três fatores em estudo: o tempo de incubação do marcador DCFH-DA, a sua concentração e a concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O percentual de formação de ROS comparado ao controle negativo (100%) está representado nas **Figura 6**. A formação de ROS em HepG2 não variou tanto quanto em fibroblastos, onde neste último a formação de ROS foi maior no tempo de incubação de 35 minutos e nas concentrações de 500 e 450 µM para o marcador DCFH-DA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente.

Foi realizada uma superfície resposta das três condições testadas em HepG2 e células de fibroblastos (**Figura 8**), permitindo observar as condições que combinadas apresentaram melhor resultado na intensidade de fluorescência, sendo estas representadas na região ótima do gráfico (>1). As **Figura 8A e 8D** representam a combinação das concentrações do DCFH-DA com os tempos de incubação, apresentando a região ótima aproximadamente entre as concentrações de 450 a 850 µM do DCFH-DA e 15 a 35 minutos de incubação para HepG2 e 30-50 minutos para Balb/C 3T3 clone A31. A **Figura 8B e 8E** mostra a combinação entre as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os tempos de incubação, indicando a região ótima com concentração acima de 400 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tempos de incubação correspondentes ao anteriormente mencionados. Por fim, nas **Figura 8C e 8F** são representadas a combinação das concentrações do DCFH-DA com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, obtendo como região ótima concentrações acima de 400 µM para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de 500 a 800 µM para o DCFH-DA. Dessa forma, foram definidas as melhores condições para o ensaio nas duas linhagens celulares com a concentração do marcador DCFH-DA em 500 µM, o tempo de incubação em 30 minutos e a concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 500 µM. As imagens da linhagem HepG2 tratada nas condições estabelecidas foram feitas através do microscópio de fluorescência invertido Evos XL (**Figura 7**).

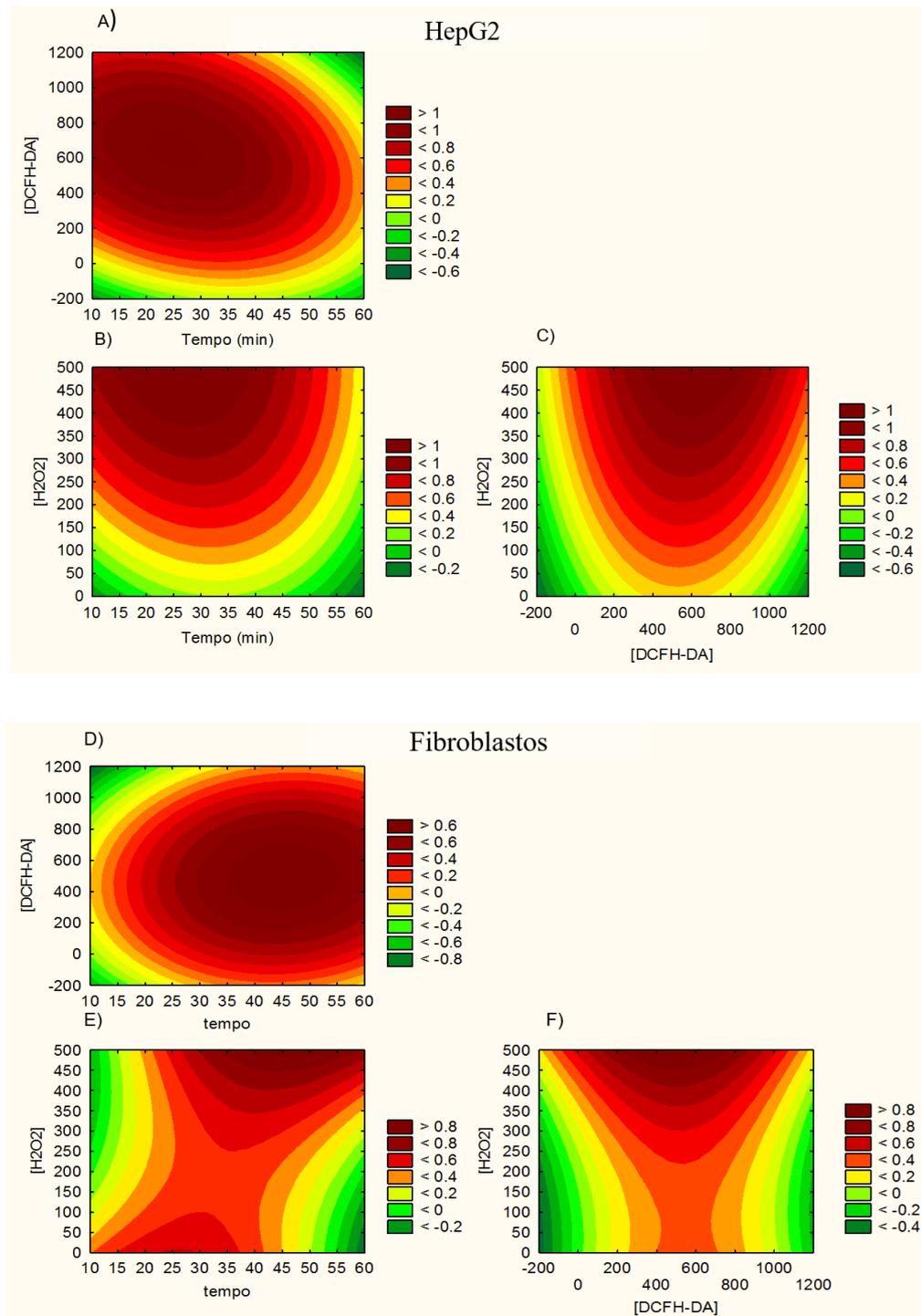
**Figura 6.** Formação de ROS pelo controle positivo (DCFH-DA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em relação ao controle negativo (sem a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Figura 7.** Células HepG2 sem tratamento (controle negativo) e tratadas com 500 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 30 minutos de incubação com 500 µM de DCFH-DA.



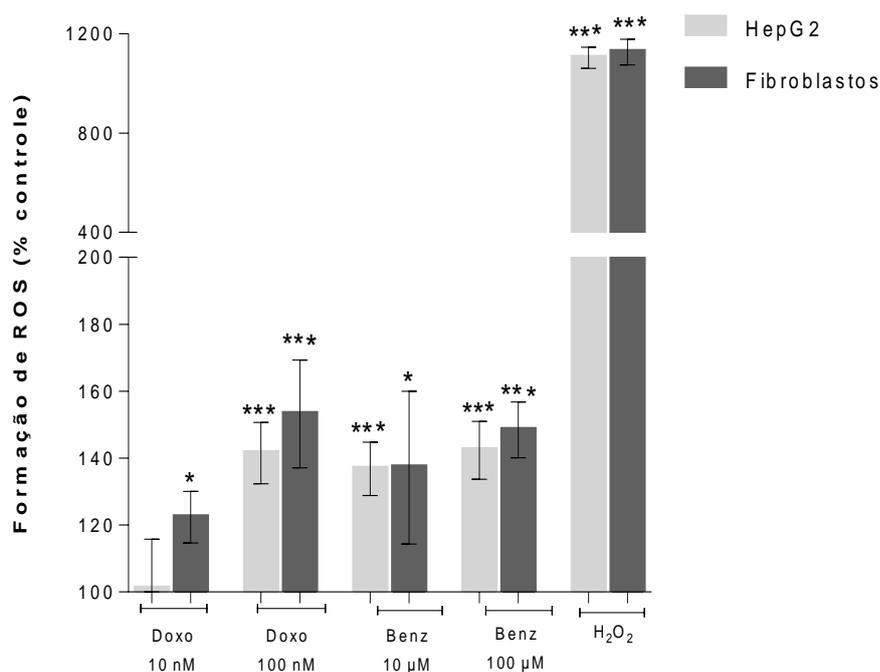
**Figura 8.** Superfície resposta e condição ótima atingida para as três variáveis analisadas em HepG2 (A, B, C) e fibroblastos (D, E, F). A coloração representada por  $> 1$  abrange a região com as condições ótimas para cada combinação das variáveis. A e D) Combinação das concentrações do DCFH-DA com os tempos de incubação. B e E) Combinação das concentrações do  $H_2O_2$  com os tempos de incubação. C e F) Combinação das concentrações do DCFH-DA e do  $H_2O_2$ .



#### 4.1.1.2 Detecção de ROS nas substâncias de referência

A detecção da formação de ROS induzida pelas substâncias é demonstrada na **Figura 9**. O percentual da formação de ROS foi determinado a partir do controle negativo (células sem tratamento), considerado como 100%. Para esses ensaios foram utilizadas concentrações dos compostos que não apresentam efeito citotóxico às células. Após 24 horas de incubação as duas substâncias induziram a formação de ROS nas duas linhagens celulares. Esse aumento dos níveis de ROS foi demonstrado por outros autores<sup>108,126</sup> e essa alteração pode estar relacionada com os efeitos adversos que os tratamentos desses fármacos causam.<sup>127,128,129</sup>

**Figura 9.** Detecção de ROS em células HepG2 e fibroblastos tratados com doxorrubicina (Doxo) e benzonidazol (Benz) por 24 horas. Como controle positivo foi utilizado o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 500 µM e como controle negativo foram utilizadas as linhagens celulares sem tratamento, sendo considerado como 100%. p\*\*\* < 0,001; p\* < 0,005.



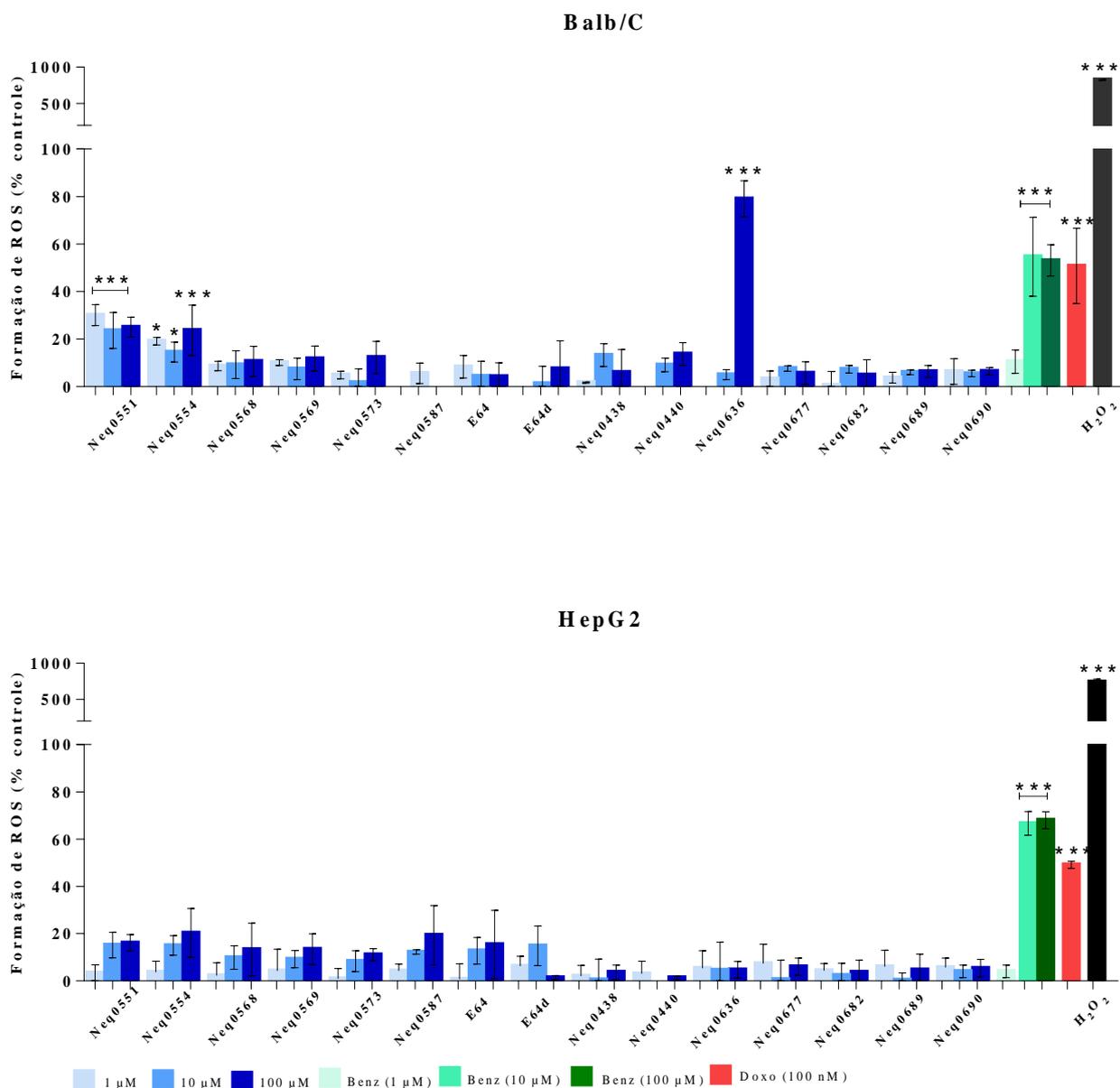
#### 4.1.2 Triagem das substâncias em estudo

A triagem realizada em 15 substâncias em estudo no Grupo NEQUIMED e nos fármacos de referência, doxorrubicina e benzonidazol, é apresentada na **Figura 10**. Os

resultados são apresentados como porcentagem em relação ao controle negativo. Os novos inibidores não aumentaram os níveis de ROS na linhagem HepG2, enquanto que em Balb/C as substâncias Neq0551 e Neq0554 aumentaram aproximadamente 20% e o Neq0636 induziu 78% em concentração mais alta (100  $\mu$ M). Os fármacos de referência levaram ao aumento de ROS nas duas linhagens celulares. Em Balb/C ambos induziram aproximadamente 50%, já em HepG2 o benzonidazol induziu mais de 60% em concentrações de 10 e 100  $\mu$ M e doxorrubicina levou ao aumento de aproximadamente 49%.

Algumas substâncias apresentaram respostas diferentes para as duas linhagens celulares, aumentando os níveis de ROS em Balb/C e em HepG2 não. As duas linhagens usadas nesta triagem apresentam diversas diferenças entre elas, como na composição de isoforma, expressão e atividade catalítica de enzimas que participam na metabolização de fármacos e xenobióticos.<sup>130</sup> Além disso, as enzimas do citocromo P450, que são as principais metabolizadoras de fármacos, são expressas principalmente em hepatócitos e em menor quantidade nas células de outros tecidos.<sup>131</sup> Embora a HepG2 apresente menores níveis dessas enzimas expressas em relação às células primárias,<sup>132</sup> esta linhagem expressa essas enzimas metabolizadoras em maior proporção do que fibroblastos. Essas diferenças podem estar relacionadas com as respostas das células aos tratamentos com as substâncias Neq0551, Neq0554 e Neq0636, uma vez que o metabolismo mais rápido destes compostos pode ter levado a uma redução na produção de ROS.

**Figura 10.** Detecção de ROS nas substâncias em estudo pelo grupo NEQUIMED e nas substâncias de referência benzonidazol (Benz) e doxorrubicina (Doxo). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado como controle positivo em 500 µM. p\* < 0,005; p\*\*\* < 0,001.



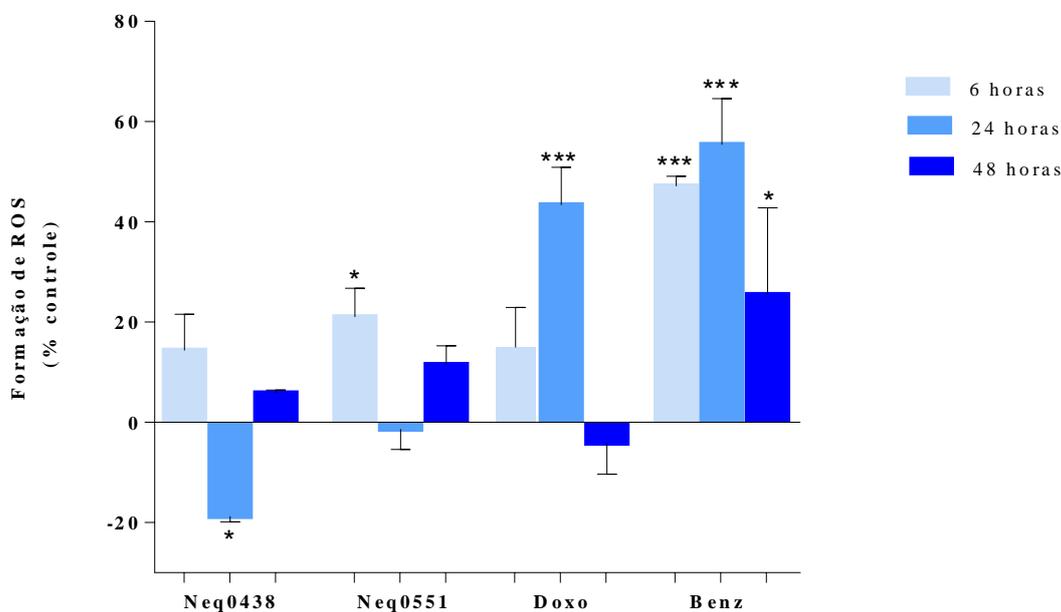
#### 4.1.3 Detecção de ROS em curta e longa exposição aos tratamentos

Após a triagem das substâncias em estudo, os compostos Neq0438 e Neq0551 foram selecionadas para os demais ensaios realizados com HepG2. Esta linhagem celular foi selecionada para os demais ensaios devido às suas propriedades estruturais, funcionais e bioquímicas semelhantes às observadas *in vivo*, além de serem facilmente disponíveis. Tais

características tornam a HepG2 uma linhagem padrão utilizada como modelo *in vitro* para ensaios toxicológicos.<sup>133,134,135</sup>

O ensaio de curta e longa exposição foi feito em 6, 24 e 48 horas de tratamento com as substâncias selecionadas e com os fármacos de referência. Os resultados são apresentados como porcentagem do controle negativo na **Figura 11**. Neq0438 obteve um pequeno aumento nos níveis de ROS em 6 horas, decaindo para quase 20% a menos que o controle negativo com 24 horas e voltando aos níveis normais em 48 horas. Neq0551 induziu o aumento de aproximadamente 20% em 6 horas, voltando aos níveis normais em 24 horas e obteve um pequeno aumento em 48 horas. Doxorrubicina induziu um pequeno aumento em 6 horas, aumentando para quase 45% em 24 horas e retornando aos níveis normais em 48 horas. Por fim, o benzonidazol induziu aproximadamente 47% em 6 horas e 55% em 24 horas, decaindo para 25% em 48 horas.

**Figura 11.** Detecção de ROS após tratamentos de 6, 24 e 48 horas com as substâncias Neq0438, Neq0551 e benzonidazol (Benz) em 10  $\mu$ M e doxorrubicina (Doxo) em 0,1  $\mu$ M.  $p^* < 0,005$ ;  $p^{***} < 0,001$ .

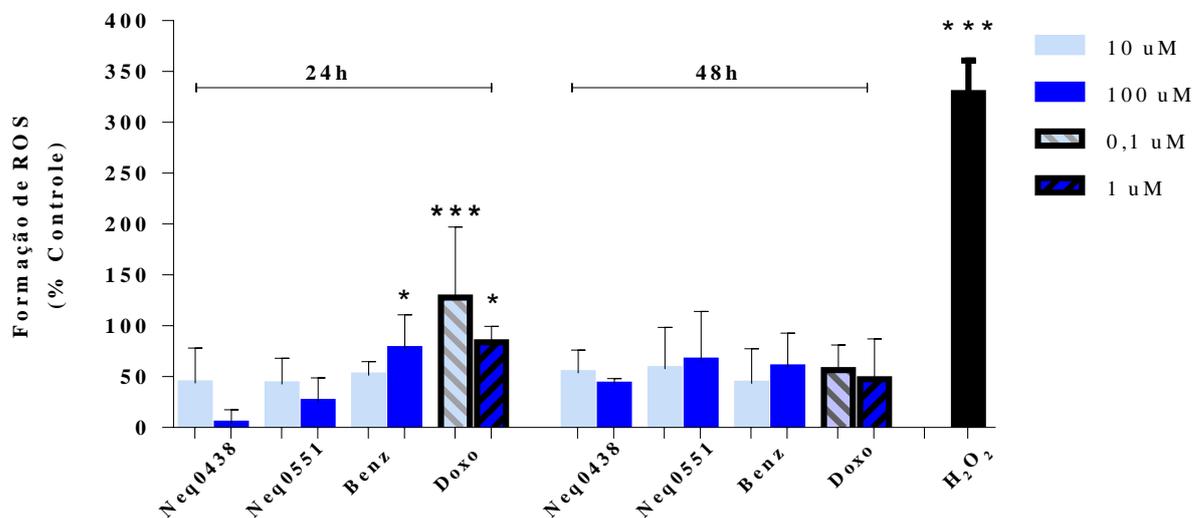


Rigalli, J. P. e colaboradores fizeram um estudo em células HepG2 utilizando concentração mais alta de benzonidazol (200  $\mu\text{M}$ ) em diferentes tempos de incubação, para investigar o sistema redox intracelular e os mecanismos adaptativos dos sistemas de defesa desencadeados para neutralizar os danos oxidativos. Diferente dos dados encontrados neste trabalho, eles mostraram níveis mais altos de ROS em curto tempo de tratamento (3 h), no entanto, em 24 horas ainda havia níveis significativos de ROS, que também começaram a decair em 48 horas.<sup>136</sup> Além disso, estudos com doxorrubicina em outras linhagens celulares também obtiveram maiores níveis de ROS em 24 horas de tratamento.<sup>137,138</sup> Panchuk, R. R. e colaboradores fizeram uma análise em curta e longa exposição de células-T leucêmicas à doxorrubicina e só observaram um aumento significativo na quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com 24 horas de tratamento,<sup>137</sup> assim como foi observado no presente estudo para células HepG2.

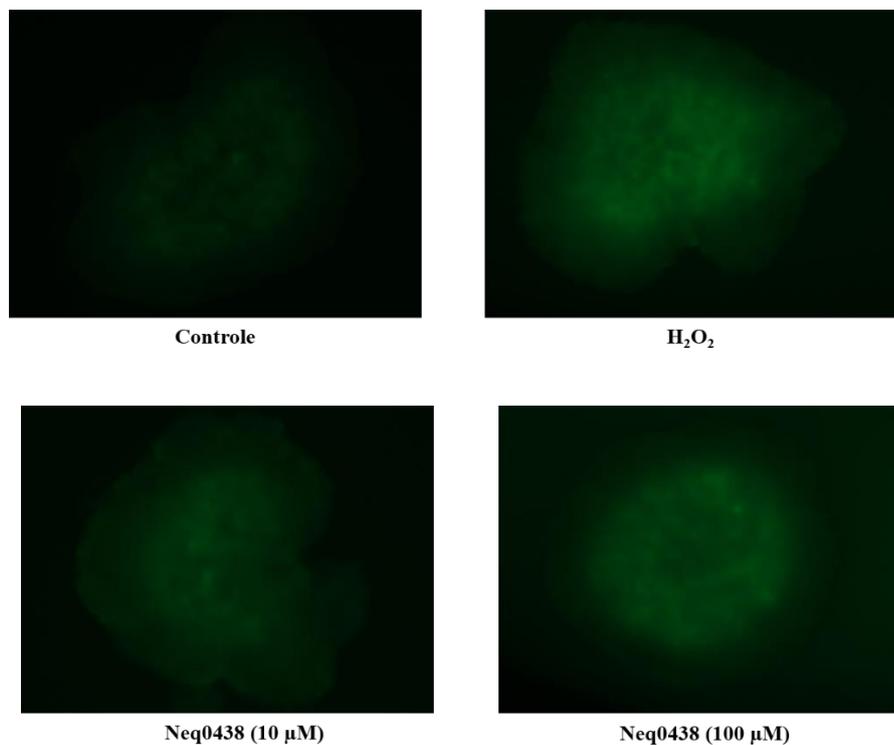
#### 4.1.4 Detecção de ROS em esferoides de HepG2

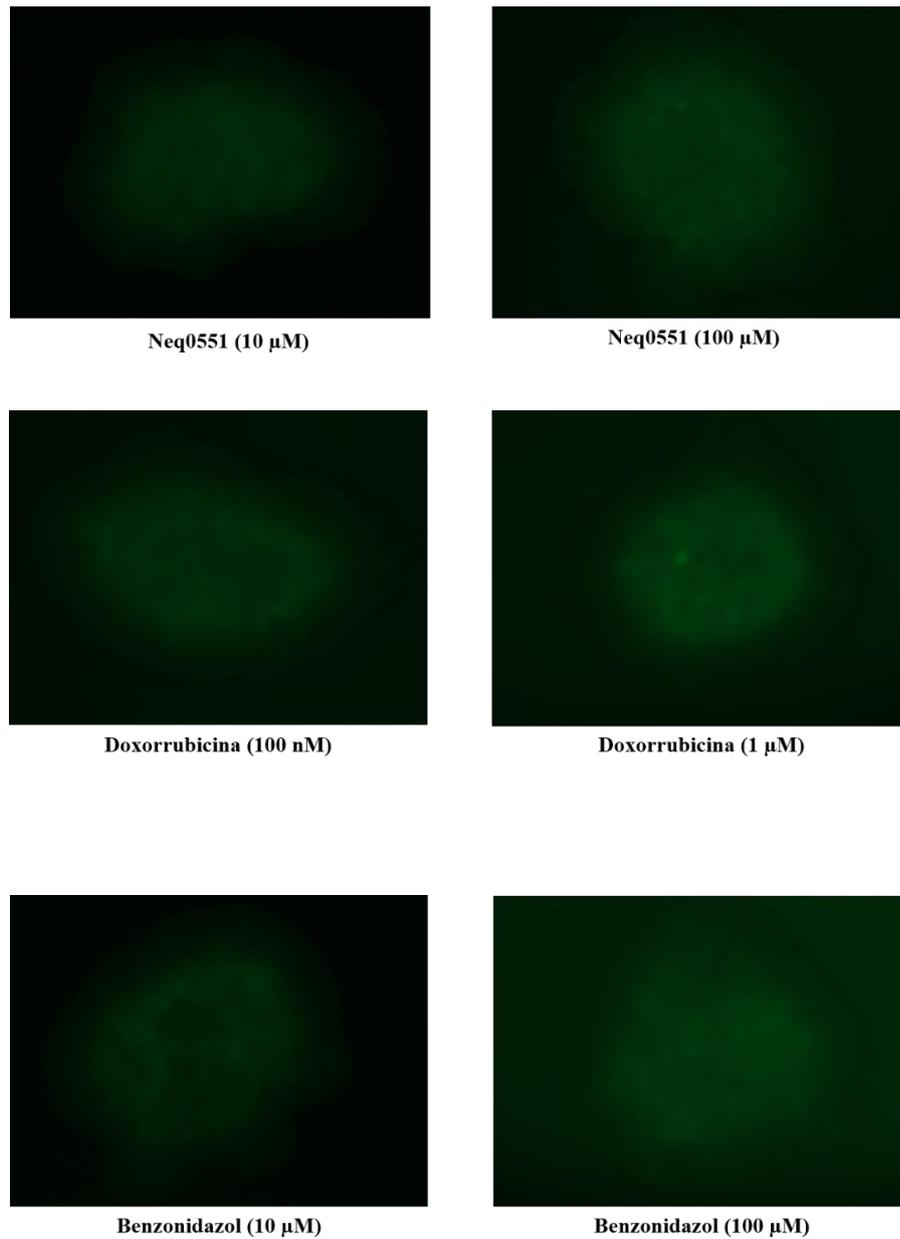
A detecção de ROS em esferoides de HepG2 foi feita após 24 e 48 horas de tratamento com as substâncias em concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  para Neq0438, Neq0551 e benzonidazol; e 0,1 e 1  $\mu\text{M}$  para doxorrubicina. Os tratamentos foram comparados com o controle negativo (esferoides sem tratamento) e os resultados são apresentados na **Figura 12**. Com 48 horas, a indução da formação de ROS não teve diferença para qualquer substância. Em 24 horas de tratamento, benzonidazol e doxorrubicina levaram ao aumento nos níveis de ROS, enquanto que Neq0438 e Neq0551 não tiveram diferença em relação ao controle negativo. O tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de benzonidazol aumentou aproximadamente 80% na quantificação de ROS, enquanto que a doxorrubicina aumentou aproximadamente 110% em 0,1  $\mu\text{M}$  e 80% em 1  $\mu\text{M}$ . As imagens dos esferoides foram feitas com o microscópio de fluorescência invertido Evos FL (Thermo Fischer Sci.) e demonstram qualitativamente a maior fluorescência para o benzonidazol e doxorrubicina em relação às outras substâncias (**Figura 13**).

**Figura 12.** Detecção de ROS em esferoides de HepG2 tratados por 24 e 48 horas com as substâncias. Como controle positivo foi utilizado o  $H_2O_2$  em  $500 \mu M$  e como controle negativo foram utilizados os esferoides sem tratamento.  $p^*= 0,005$ ;  $p^{***}= 0,001$ .



**Figura 13.** Esferoides de HepG2 tratados com  $500 \mu M$  de DCFH-DA após 24 horas de tratamento com as substâncias.





Embora os valores encontrados não tenham sido os mesmos para as culturas 2D e 3D, estas tiveram o mesmo perfil de resposta após tratamento com as substâncias, visto que em ambas culturas os fármacos de referência (benzonidazol e doxorubicina) tiveram a maior quantificação de ROS em 24 horas de incubação, enquanto que Neq0438 e Neq0551 não induziram um aumento significativo. No entanto, em cultura 3D a quantificação foi maior para os dois fármacos, sendo que para doxorubicina a formação de ROS foi 65% maior e para benzonidazol foi 25% (**Figura 11** e **Figura 12**). Roegner, A. F. e Puschner, B. também

reportaram maior formação de ROS em cultura tridimensional de HepG2 utilizando o marcador fluorescente DCFH-DA.<sup>139</sup>

Estudos mostram que células tumorais geram maiores quantidades de ROS de forma endógena, elevando o estado redox intracelular. Isso está relacionado ao crescimento descontrolado dessas células, visto que a geração de grandes quantidades de ROS pode contribuir para a capacidade dos tumores em induzir mutações, suprimir inibidores de proteases e promover a invasão e metástase.<sup>140,141</sup> Como as culturas tridimensionais mimetizam melhor o tumor *in vivo*, elas apresentam características que não são encontradas em culturas de monocamadas. Esferoides de HepG2 demonstram ter melhor expressão e funcionalidade comparados às culturas 2D. A organização das células e da matriz extracelular nos esferoides está correlacionada com a melhor regulação de genes metabólicos, com o aumento da produção de albumina, da atividade de transportadores de fármacos hepáticos e da expressão de enzimas do citocromo P450.<sup>142,143</sup> Essas características podem explicar a diferença nos resultados encontrados neste trabalho em relação aos níveis de ROS produzidos pelas culturas 2D e 3D de HepG2.

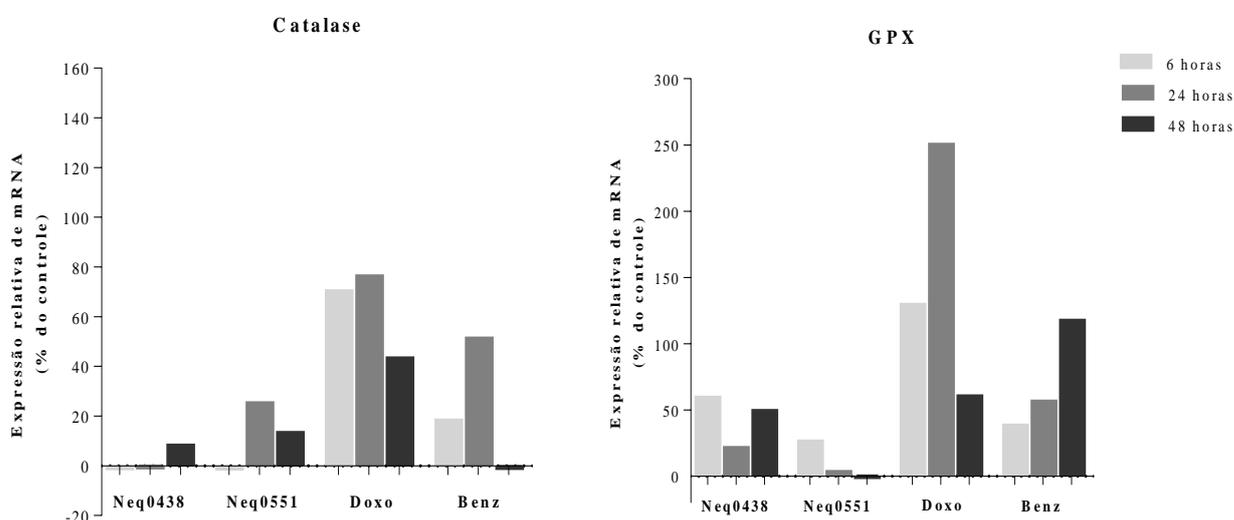
Sauer, H. e colaboradores fizeram estudos com doxorrubicina em esferoides de DU-145 (linhagem de câncer de próstata) e também mostraram que houve aumento nos níveis de ROS, o que gerou peroxidação lipídica das células.<sup>144</sup> A peroxidação lipídica resulta na degradação oxidativa das membranas celulares, o que leva a alterações estruturais e nas suas propriedades de permeabilidade.<sup>145</sup> Wartenberg, M. e colaboradores também reportaram estudos com esferoides de DU-145 utilizando doxorrubicina e o marcador fluorescente DCFH-DA. Eles mostraram que a expressão de Glicoproteína-P está relacionada ao metabolismo glicolítico das células tumorais e pode ser regulada por inibidores da glicólise através de mecanismos que envolvem mudanças no estado redox celular.<sup>146</sup> Esses resultados encontrados na literatura corroboram com os resultados deste trabalho, mostrando que o fármaco doxorrubicina leva ao aumento da geração de ROS em maiores níveis em culturas 3D.

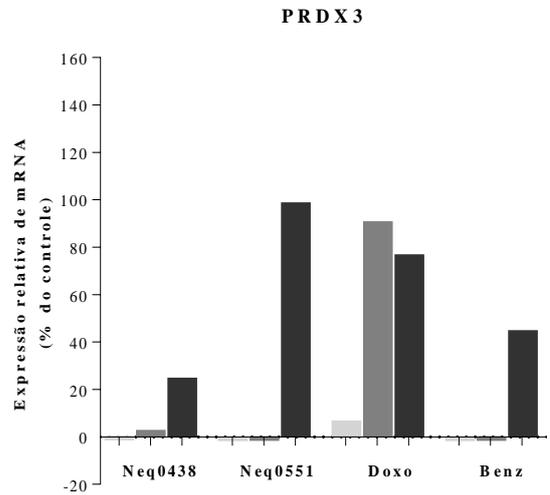
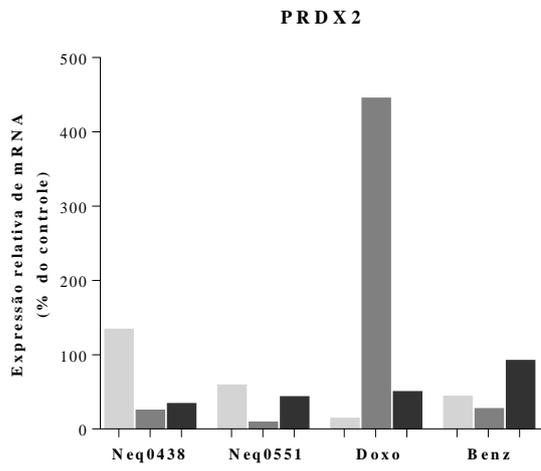
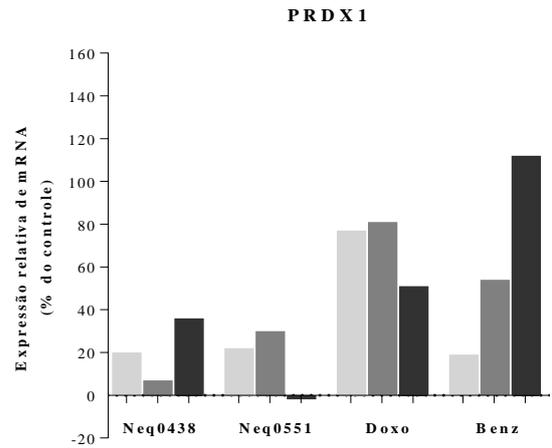
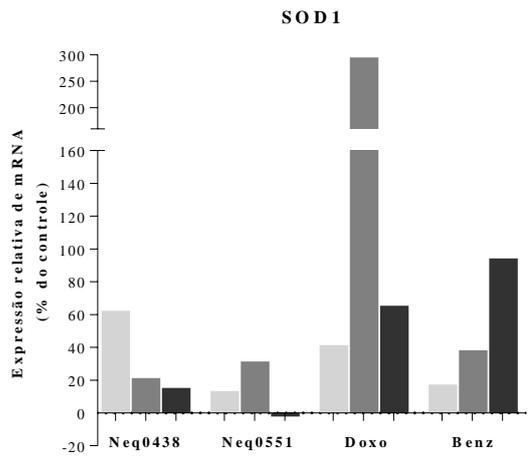
## 4.2 Avaliação do sistema antioxidante enzimático

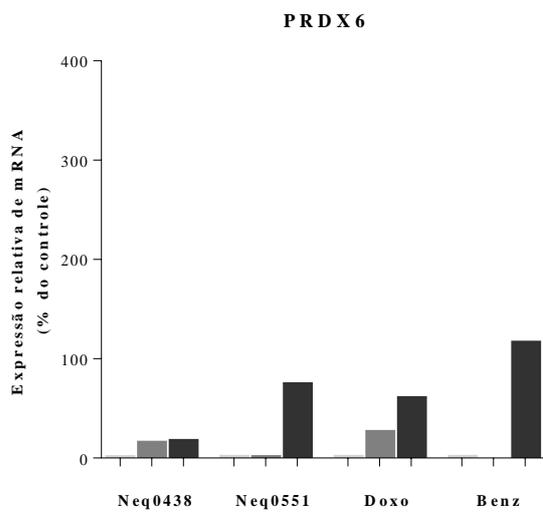
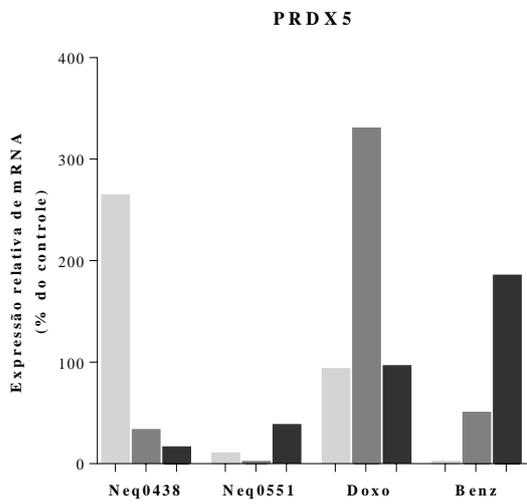
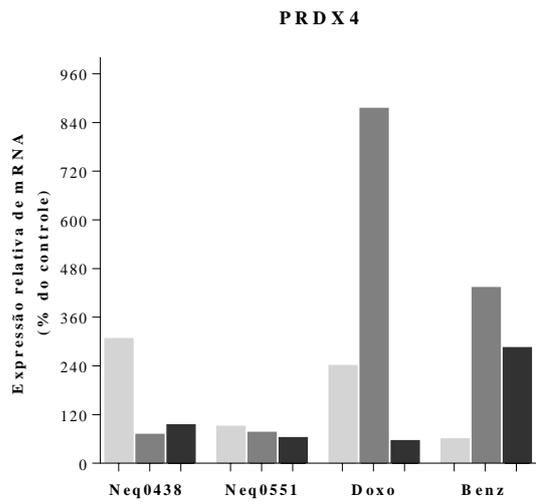
### 4.2.1 Estudo da expressão gênica (qRT-PCR)

A expressão gênica de nove enzimas antioxidantes após tratamento da linhagem HepG2 com as substâncias Neq0438 (10  $\mu$ M), Neq0551 (10  $\mu$ M), doxorubicina (0,1  $\mu$ M) e benzonidazol (10  $\mu$ M) é mostrada na **Figura 14**. Os tratamentos foram feitos em 6, 24 e 48 horas e foram comparados com o controle negativo, composto pelas células sem tratamento. Os resultados são apresentados como porcentagem do controle e mostram que todos os tratamentos induziram alterações nos níveis de expressão gênica das enzimas, aumentando a expressão em todos os tempos de tratamentos. A substância Neq0438 levou a uma maior elevação nos níveis de mRNA de PRDX2 (132%), PRDX4 (303%) e PRDX5 (263%) em 6 horas (**Tabela 6**). O Neq0551 induziu uma alteração maior em 48 horas, obtendo uma elevação mais pronunciada de mRNA de PRDX3 (98%) em 48 horas e PRDX4 (87%) em 6 horas (**Tabela 7**). O fármaco doxorubicina teve a maior alteração nos níveis de expressão das enzimas, chegando a aumentar 871% a expressão de PRDX4 em 24 horas (**Tabela 8**). O benzonidazol obteve uma alteração maior em 48 horas, porém teve um aumento maior para PRDX4 em 24 horas (**Tabela 9**).

**Figura 14.** Quantificação da expressão gênica das enzimas antioxidantes em células HepG2 por meio do qRT-PCR após tratamento com as substâncias em concentrações de 10  $\mu$ M para o Neq0438, Neq0551 e benzonidazol (Benz) e 0,1  $\mu$ M para doxorubicina (Doxo). Valores dados como porcentagem do controle negativo.







**Tabela 6.** Expressão gênica das enzimas após tratamento com o Neq0438 em 10  $\mu$ M. Valores dados como porcentagem do controle negativo.

<b>Enzimas</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Catalase</b>	-	-	8%
<b>GPX1</b>	59%	21%	49%
<b>SOD1</b>	61%	20%	14%
<b>PRDX1</b>	19%	6%	35%
<b>PRDX2</b>	132%	23%	32%
<b>PRDX3</b>	-	-	24%
<b>PRDX4</b>	303%	67%	91%
<b>PRDX5</b>	263%	32%	15%
<b>PRDX6</b>	-	15%	17%

**Tabela 7.** Expressão gênica das enzimas após tratamento com o Neq0551 em 10  $\mu$ M. Valores dados como porcentagem do controle negativo.

<b>Enzimas</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Catalase</b>	-	25%	13%
<b>GPX1</b>	26%	-	-
<b>SOD1</b>	12%	30%	-
<b>PRDX1</b>	21%	29%	-
<b>PRDX2</b>	57%	7%	41%
<b>PRDX3</b>	-	-	98%
<b>PRDX4</b>	87%	72%	59%
<b>PRDX5</b>	9%	-	37%
<b>PRDX6</b>	-	-	74%

**Tabela 8.** Expressão gênica das enzimas após tratamento com doxorubicina em 0,1  $\mu$ M. Valores dados como porcentagem do controle negativo.

<b>Enzimas</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Catalase</b>	70%	76%	43%
<b>GPX1</b>	129%	250%	60%
<b>SOD1</b>	40%	291%	64%
<b>PRDX1</b>	76%	80%	50%
<b>PRDX2</b>	12%	443%	48%
<b>PRDX3</b>	6%	90%	76%
<b>PRDX4</b>	237%	871%	52%
<b>PRDX5</b>	92%	329%	95%
<b>PRDX6</b>	-	26%	60%

**Tabela 9.** Expressão gênica das enzimas após tratamento com benzonidazol em 10  $\mu$ M. Valores dados como porcentagem do controle negativo.

<b>Enzimas</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Catalase</b>	18%	51%	-
<b>GPX1</b>	38%	56%	117%
<b>SOD1</b>	16%	37%	93%
<b>PRDX1</b>	18%	53%	111%
<b>PRDX2</b>	42%	25%	90%
<b>PRDX3</b>	-	-	44%
<b>PRDX4</b>	56%	429%	281%
<b>PRDX5</b>	56%	49%	184%
<b>PRDX6</b>	-	-	116%

Esses resultados mostram que o aumento na expressão das enzimas antioxidantes foi correspondente ao aumento nos níveis de ROS. Os compostos Neq0438 e Neq0551 tiveram

maior aumento geral da expressão em 6 e 48 horas, o que também foi visto no ensaio de detecção de ROS, onde em 6 h teve o aumento máximo de ROS e em 48 h teve um pequeno aumento comparado à 24 h (**Figura 11**). Os resultados para doxorrubicina também condizem com os níveis de ROS, pois foi observado um grande aumento na expressão das enzimas em 24 h, diminuindo bastante em 48 h, o mesmo perfil obtido na detecção de ROS (**Figura 11**). O benzonidazol, por sua vez, aumentou a expressão das enzimas em 24 h, porém, manteve uma alta indução em 48 h, que se justifica pelo seu perfil de indução de ROS, no qual teve um aumento maior em 24 h, porém, em 48 h de tratamento ainda foi observado altos níveis de ROS (**Figura 11**).

A PRDX4 apresentou nível de expressão gênica mais elevado após tratamento com as substâncias em estudo, com maior aumento para doxorrubicina. Esta proteína tem sido associada à regulação do fator de transcrição pró-inflamatório nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e pode interagir com quinases responsivas ao estresse, proteínas de membrana e moduladores imunológicos.<sup>147</sup> Vários autores reportam que a expressão da PRDX4 é alterada sob condições patológicas, como o câncer e diabetes, dessa forma ela é considerada um potencial biomarcador na predição de estágios iniciais ou de futuras doenças que envolvem a desregulação do sistema redox.<sup>147</sup>

As enzimas catalase, SOD e GPX são consideradas as principais antioxidantes e tiveram mais alterações através dos tratamentos com os fármacos doxorrubicina e benzonidazol, corroborando com o ensaio de detecção de ROS, no qual os dois fármacos aumentaram significativamente os níveis de ROS. A SOD catalisa a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  a  $O_2$  e  $H_2O_2$ , e representa a primeira linha de defesa enzimática contra ROS. A catalase decompõe o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular, desempenhando um papel importante na proteção celular contra danos reativos. E por fim, a GPX, que catalisa a conjugação de diversas espécies, incluindo o  $H_2O_2$ .<sup>148,128</sup> Muitos autores reportaram estudos com doxorrubicina mostrando o aumento nos níveis dessas principais enzimas antioxidantes, tanto em relação à expressão, quanto à atividade enzimática. Além disso, grande parte estuda a expressão dessas enzimas como possíveis terapias contra a toxicidade gerada por este fármaco.<sup>149,150,151,152</sup>

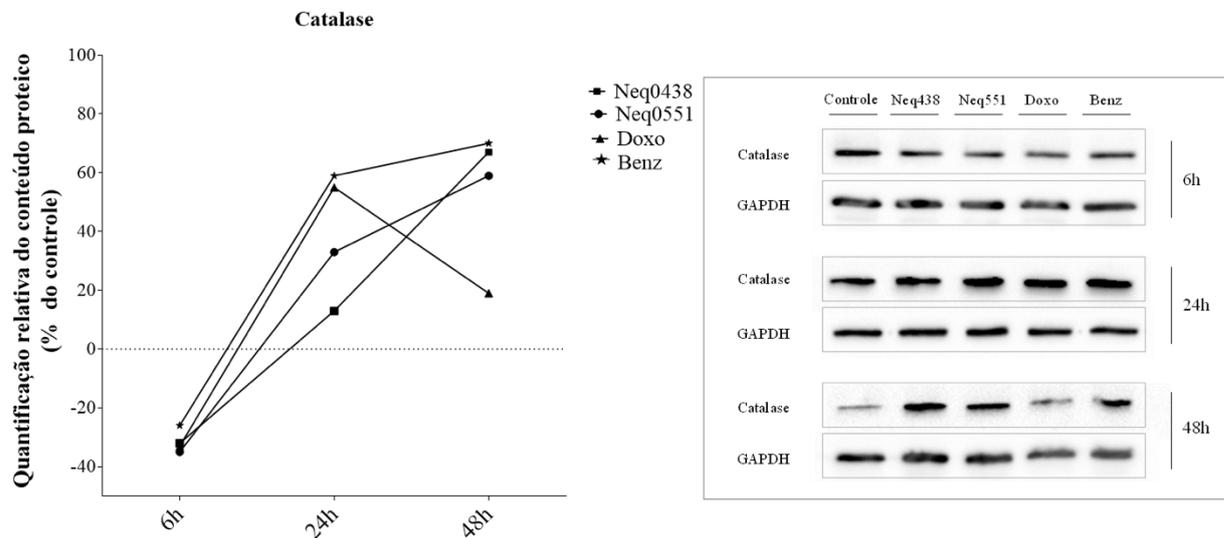
Estudos com linhagens celulares resistentes à doxorrubicina mostram que essas células apresentam níveis de expressão elevados para as PRDXs, evidenciando que essas enzimas tem um papel importante contra a morte induzida por apoptose mediada por ROS.<sup>153</sup> Alguns autores reportaram evidências do envolvimento da PRDX5 na quimioresistência da

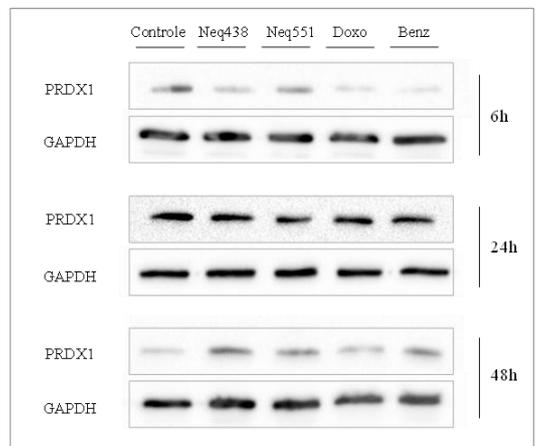
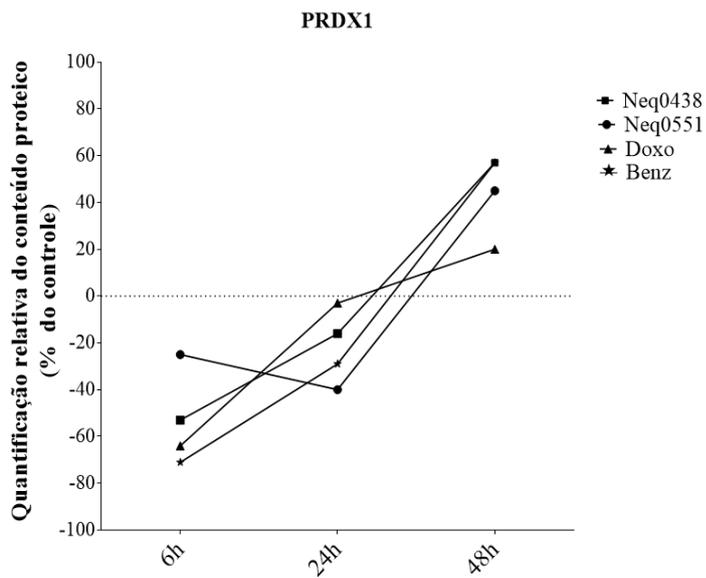
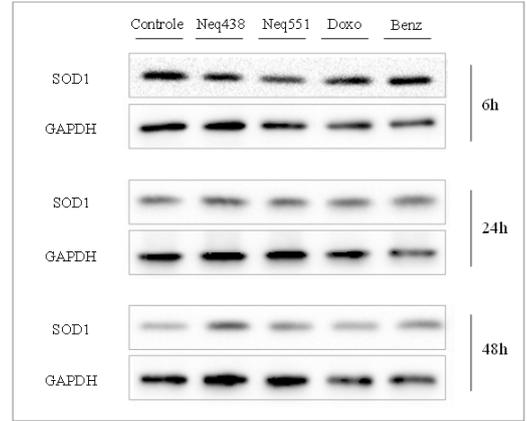
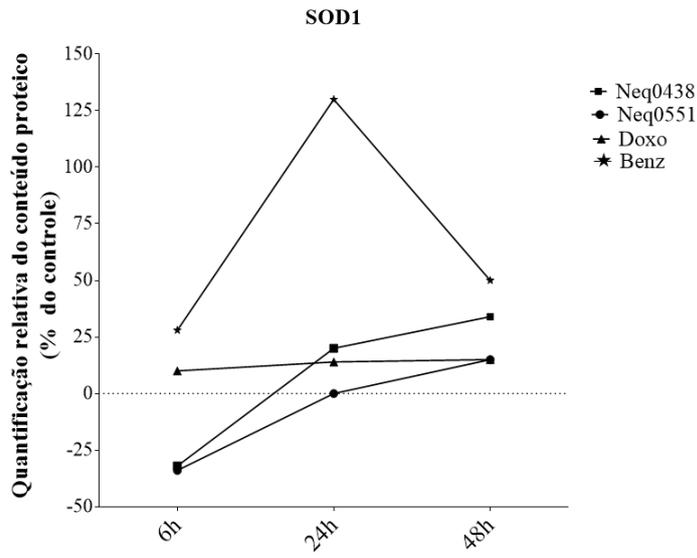
doxorubicina<sup>154</sup> e além disso, Wang, T. e colaboradores mostraram o efeito das PRDX2 na sensibilidade da doxorubicina, que decai com o aumento nos níveis de expressão gênica dessa enzima.<sup>155</sup>

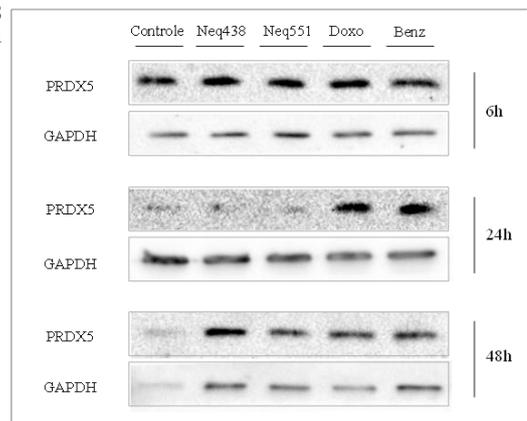
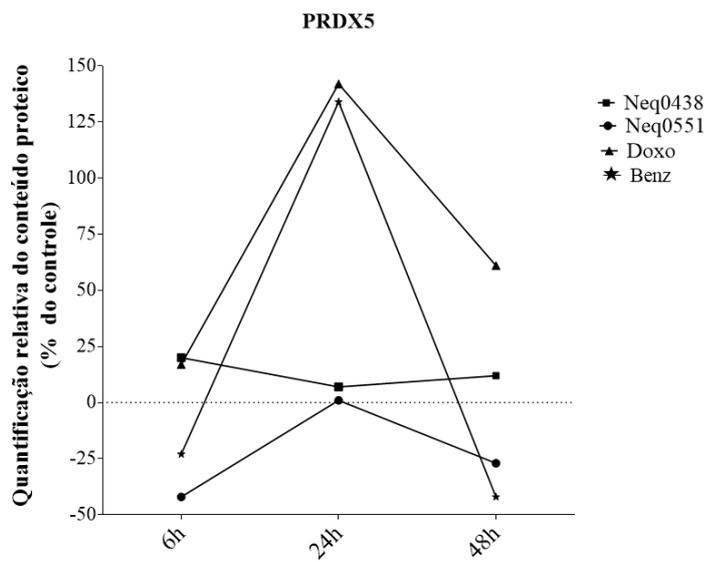
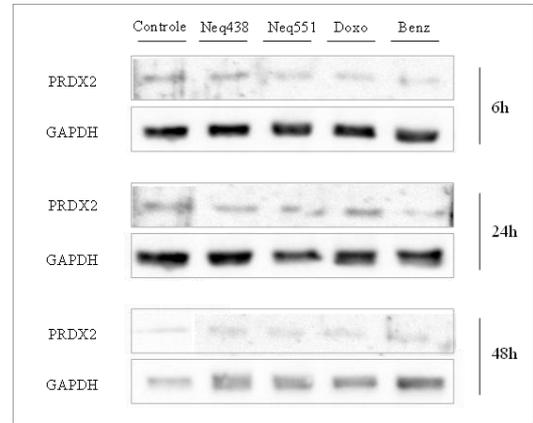
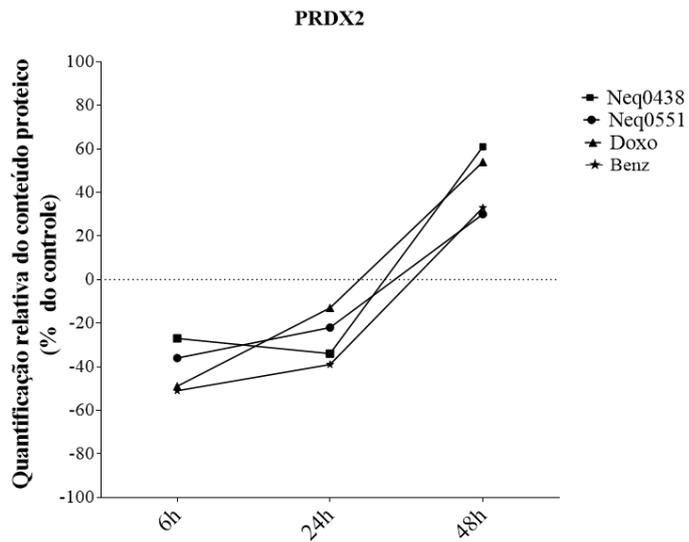
## 2.2 Quantificação do conteúdo proteico intracelular (Western blot)

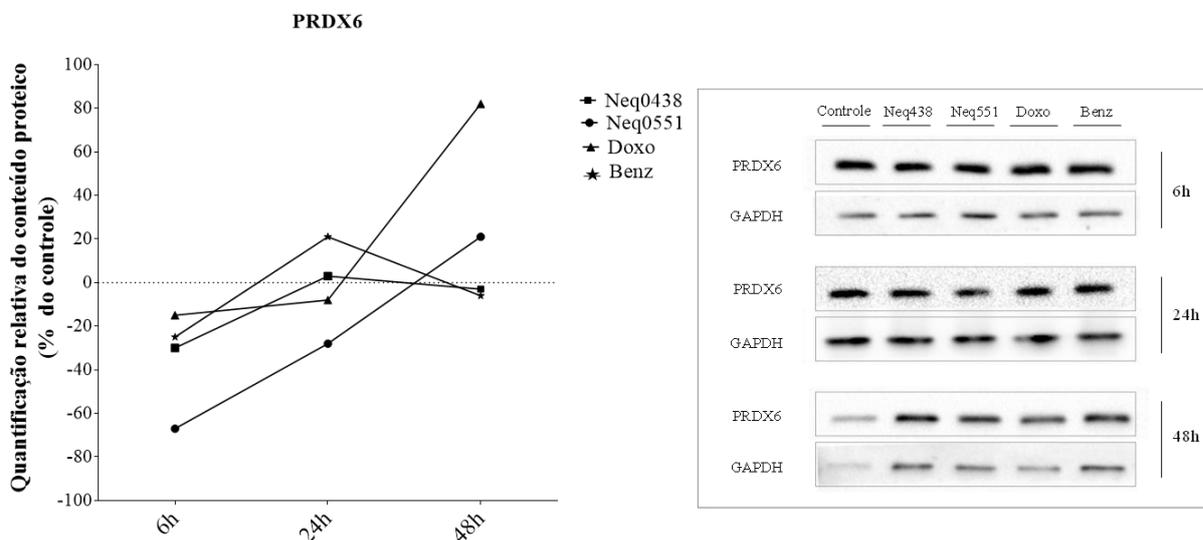
O conteúdo proteico intracelular das enzimas catalase, SOD1, PRDX1, PRDX2, PRDX5 e PRDX6 foi quantificado após diferentes tempos de tratamento (6, 24 e 48 h) com as substâncias Neq0438 (10  $\mu$ M), Neq0551 (10  $\mu$ M), doxorubicina (0,1  $\mu$ M) e benzonidazol (10  $\mu$ M), e os resultados são apresentados na **Figura 15** como porcentagem do controle negativo. Não foi possível realizar a análise por Western blot com as outras enzimas utilizadas no qRT-PCR até o momento.

**Figura 15.** Western blotting para a quantificação do conteúdo proteico utilizando GAPDH como normalizador endógeno. Os tratamentos foram feitos em concentrações de 10  $\mu$ M para o Neq0438, Neq0551 e benzonidazol (Benz) e 0,1  $\mu$ M para doxorubicina (Doxo). Valores dados como porcentagem do controle negativo.









O Neq0438 (**Tabela 10**) inibiu as enzimas antioxidantes em 6 h de tratamento, com exceção da PRDX5 que teve um aumento de 20%. Em 24 h houve um pequeno aumento de algumas enzimas (catalase, PRDX5 e PRDX6) e aumento de 20% da SOD1, enquanto as PRDXs 1 e 2 continuaram inibidas. Já em 48 h de tratamento, com exceção da PRDX6 todas as enzimas tiveram o conteúdo proteico aumentado.

O tratamento com o Neq0551 (**Tabela 11**) teve uma resposta semelhante ao Neq0438. Em 6 h houve a inibição de todas as enzimas, com maior inibição da PRDX6 (-67%). Após 24 h de tratamento a catalase aumentou 33%, enquanto as enzimas PRDX1, PRDX2 e PRDX6 continuaram inibidas. Por fim, em 48h houve um aumento das enzimas, com exceção da PRDX5 que foi inibida (-27%).

Doxorrubicina levou a maiores alterações comparada aos Neqs (**Tabela 12**). Em 6 h induziu a inibição das enzimas catalase (-33%), PRDX1 (-64%), PRDX2 (-49%) e PRDX6 (-15%), bem como o aumento da SOD1 (10%) e da PRDX5 (17%). Após 24h levou a baixa inibição das PRDXs 1, 2 e 6, enquanto a PRDX5 teve um grande aumento (142%),

juntamente com o aumento da catalase e SOD1. Com 48 h de tratamento induziu o aumento de todas as enzimas, com maior indução na PRDX6 (82%).

O composto que mais alterou o conteúdo proteico foi o benzonidazol (**Tabela 13**). Este fármaco levou a inibição das PRDXs e catalase em 6 h de tratamento, com maior inibição da PRDX1 (-71%), enquanto aumentou 28% da SOD1. Em 24 h induziu um grande aumento da SOD1 (130%) e PRDX5 (134%), juntamente com um aumento menor da catalase e PRDX6, e inibição da PRDX1 e PRDX2. Após 48 h levou ao aumento da catalase, SOD1, PRDX1 e PRDX2, enquanto as enzimas PRDX5 e PRDX6 foram inibidas.

**Tabela 10.** Conteúdo proteico expresso após tratamento com o Neq0438 em 10  $\mu$ M. Valores dados como porcentagem do controle negativo.

<b>Enzimas</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Catalase</b>	-32%	13%	67%
<b>SOD1</b>	-32%	20%	34%
<b>PRDX1</b>	-53%	-16%	57%
<b>PRDX2</b>	-27%	-34%	61%
<b>PRDX5</b>	20%	7%	12%
<b>PRDX6</b>	-30%	3%	-3%

**Tabela 11.** Conteúdo proteico expresso após tratamento com o Neq0551 em 10  $\mu$ M. Valores dados como porcentagem do controle negativo.

<b>Enzimas</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Catalase</b>	-35%	33%	59%
<b>SOD1</b>	-34%	-	15%
<b>PRDX1</b>	-25%	-40%	45%
<b>PRDX2</b>	-36%	-22%	30%
<b>PRDX5</b>	-42%	1	-27%
<b>PRDX6</b>	-67%	-28%	21%

**Tabela 12.** Conteúdo proteico expresso após tratamento com doxorrubicina em 0,1  $\mu$ M. Valores dados como porcentagem do controle negativo.

<b>Enzimas</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Catalase</b>	-33%	55%	19%
<b>SOD1</b>	10%	14%	15%
<b>PRDX1</b>	-64%	-3%	20%
<b>PRDX2</b>	-49%	-13%	54%
<b>PRDX5</b>	17%	142%	61%
<b>PRDX6</b>	-15%	-8	82%

**Tabela 13.** Conteúdo proteico expresso após tratamento com benzonidazol em 10  $\mu$ M. Valores dados como porcentagem do controle negativo.

<b>Enzimas</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Catalase</b>	-26%	59%	70%
<b>SOD1</b>	28%	130%	50%
<b>PRDX1</b>	-71%	-29%	57%
<b>PRDX2</b>	-51%	-39%	33%
<b>PRDX5</b>	-23%	134%	-42%
<b>PRDX6</b>	-25%	21%	-6%

Todas as substâncias testadas inibiram a catalase em 6 h de tratamento e induziram um aumento em 24 h, no entanto, a indução foi maior por doxorrubicina e benzonidazol, correlacionando com os altos níveis de ROS gerados por esses fármacos nesse tempo de

incubação. Benzonidazol e os Neqs aumentaram ainda mais a quantificação de catalase em 48 h e isso também pode ser justificado pelo perfil de geração de ROS dessas substâncias. Mesmo com a diminuição de ROS em 48 h, o benzonidazol ainda levou a formação de níveis significativos, enquanto os Neqs mesmo não induzindo a formação de ROS acima do controle negativo, ainda aumentaram em relação a 24 h de tratamento, o que pode ter levado ao aumento desta enzima. Por outro lado, a doxorrubicina diminuiu a indução de catalase em 48 h, correspondendo a sua geração de ROS que teve uma grande queda nesse tempo de incubação, chegando aos níveis do controle.

A enzima SOD1 também foi inibida pelos Neqs em 6 h de tratamento, no entanto, doxorrubicina e benzonidazol induziram seu aumento, o que pode estar relacionado com o grande aumento de ROS em 24 h por esses fármacos, visto que esta enzima gera  $H_2O_2$  através da dismutação do superóxido, contribuindo para o aumento dessa espécie reativa de oxigênio. Além disso, diferente das outras substâncias o benzonidazol induziu um grande aumento de SOD1 em 24 h, o que pode estar relacionado com a sua produção de ROS em 48 h, também devido a geração do  $H_2O_2$ .

As peroxirredoxinas 1 e 2 tiveram o mesmo perfil de resposta para todas as substâncias, onde ambas foram inibidas em 6 e 24 h de tratamento, obtendo um aumento significativo em 48 h. Esses resultados mostram que essas enzimas podem estar relacionadas e que uma pode estar inibindo a outra. Sabe-se que a PRDX1 e a PRDX2 apresentam 91% de homologia, possuem o mesmo mecanismo catalítico e cinética de reação semelhante.<sup>156</sup> Estudos mostram que essas enzimas também possuem funções semelhantes, interagindo com diversas moléculas, como proteínas de membrana, receptores, proteínas redox, entre outras.<sup>157</sup> Além disso, altos níveis de peróxido podem levar à hiperoxidação dessas PRDXs, o que resulta na inativação da atividade de peroxidase e leva à formação de estruturas de alto peso molecular.<sup>158</sup>

Benzonidazol e doxorrubicina induziram um grande aumento da PRDX5 em 24 h, decaindo drasticamente em 48 h para benzonidazol, chegando a inibição de -42%. Doxorrubicina também diminuiu a indução em 48 h, mas ainda assim manteve um aumento de 62%. A PRDX5 também ajuda na eliminação de  $H_2O_2$ , portanto, seu aumento em 24 h pode ter colaborado para a diminuição de ROS induzida por doxorrubicina e benzonidazol, visto que em 48 h tanto a quantificação de ROS quanto da PRDX5 decaiu. No entanto, doxorrubicina manteve esta enzima aumentada em 48 h enquanto benzonidazol a inibiu, o que

pode estar relacionado com a maior queda de ROS nesse tempo de incubação para doxorubicina. Além disso, doxorubicina também induziu um alto aumento da PRDX6 em 48 h, também contribuindo para manter baixos níveis de ROS.

Embora a atividade das enzimas aqui presentes não tenha sido avaliada neste trabalho, ela é reportada na literatura para os fármacos de referência, porém com resultados divergentes. Novaes, R. D. e colaboradores reportaram um estudo *in vivo* com benzonidazol, mostrando aumento da atividade dessas enzimas antioxidantes hepáticas.<sup>127</sup> No entanto, outros estudos com benzonidazol mostram que não houve diferença na atividade enzimática da catalase e da SOD em 12 e 24 horas de tratamento, porém, a GPX teve um aumento de 66% em 12 horas.<sup>136</sup> Outros autores ainda reportaram que houve inibição da atividade das enzimas antioxidantes hepáticas durante tratamento com benzonidazol.<sup>128</sup> Em relação à doxorubicina, estudos *in vivo* utilizando ratos mostram que o seu tratamento leva ao aumento da atividade da catalase.<sup>159</sup> Por outro lado, Hajra, S. e colaboradores reportaram que a administração de doxorubicina inibiu a atividade das enzimas GPX, SOD e catalase em 53,70%, 53,24% e 60,52%, respectivamente.<sup>160</sup> Enquanto outros autores mostraram que o tratamento com doxorubicina induziu o aumento da atividade da GPX, sugerindo que foi devido ao dano oxidativo da sua estrutura proteica.<sup>161</sup>

A partir desses resultados não foi possível estabelecer uma relação direta entre a expressão gênica e o conteúdo proteico das enzimas, isso pode ocorrer devido a uma série de possíveis eventos pós-transcricionais.<sup>162</sup> No entanto, pode-se notar que todos os compostos induziram alterações no sistema antioxidante enzimático, de modo a controlar os níveis de ROS por eles induzidos. Foi possível observar um padrão de resposta entre o Neq0438 e o Neq0551, visto que ambos levaram a maior indução do conteúdo proteico de catalase e em níveis próximos. Para doxorubicina e benzonidazol também foi observado um padrão semelhante, dado que os dois induziram o maior aumento do conteúdo proteico na PRDX5 e em 24 horas de tratamento. Além disso, o benzonidazol também induziu um grande aumento de SOD1 e catalase comparado às outras substâncias, o que juntamente com os resultados da geração de ROS indica que este fármaco foi a substância que induziu maior estresse oxidativo.

## 4.3 Ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma

### 4.3.1 Avaliação da eficácia dos controles

Os controles para o ensaio de mutagenicidade foram testados nas linhagens TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*. A quantidade de poços revertentes é mostrada na **Tabela 14**, que também indica a taxa de reversão padrão para cada linhagem e controle. A taxa de reversão foi estabelecida proporcionalmente aos dados encontrados na literatura.<sup>87,163,90</sup> Todos os controles se enquadraram nas taxas de reversão, além de obterem uma diferença significativa entre os controles negativos e positivos, podendo serem usados como parâmetro para a avaliação das substâncias em estudo. Desta forma, o estudo prosseguiu com a avaliação das substâncias de interesse.

**Tabela 14.** Avaliação da eficiência das linhagens de *Salmonella typhimurium*.

<b>Linhagens</b>	<b>Controles</b>	<b>Poços revertentes (poços positivos/48)</b>	<b>Taxa de reversão padrão*</b>
	Negativo (sem tratamento)	2	≤ 8
<b>TA98</b>	-S9 (4-NQO + 2-NF)	44	≥ 25
	+S9 (2-AA)	45	≥ 25
	Negativo (sem tratamento)	4	≤ 12
<b>TA100</b>	-S9 (4-NQO + 2-NF)	25	≥ 25
	+S9 (2-AA)	32	≥ 25
	Negativo (sem tratamento)	18	≤ 20
<b>TA102</b>	-S9 (4-NQO)	48	≥ 25
	+S9 (2-AA)	35	≥ 25

\* Os valores discriminados como padrão para os controles positivos são dados pelo fornecedor do kit.

#### 4.3.2 Avaliação das substâncias em estudo

A atividade mutagênica das substâncias foi avaliada utilizando a linhagem TA102 de *S. typhimurium*, que detecta danos oxidativos e agentes que causam ligações cruzadas no DNA. Os resultados foram avaliados pelo método “regra de duas vezes”, no qual a duplicação da taxa de reversão espontânea em uma concentração da substâncias testada constitui uma resposta positiva.<sup>87</sup> Para isso, foi determinado o índice de mutagenicidade (IM) que consiste na razão da média dos poços revertentes induzidos pela média dos revertentes espontâneos e quando o IM é 2,0 ou mais, é considerado uma indicação significativa de mutagenicidade.<sup>164</sup>

O Neq0551 não apresentou atividade mutagênica com ou sem ativação metabólica (**Tabela 16**). O Neq0438 e o fármaco doxorubicina apresentaram atividade mutagênica somente com ativação metabólica (**Tabela 15** e **Tabela 17**), enquanto que o benzonidazol apresentou atividade mutagênica com e sem ativação metabólica (**Tabela 18**).

**Tabela 15.** Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) da linhagem TA102 de *Salmonella typhimurium* exposta à diferentes concentrações do Neq0438 com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.  $p^* = 0,05$ ;  $p^{***} = 0,001$ .

Tratamentos ( $\mu\text{M}$ )	Número de poços revertentes (M $\pm$ DP)		Índice de mutagenicidade (IM)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
3,1	17 $\pm$ 8	27 $\pm$ 3***	1,3	2,0
6,2	18,5 $\pm$ 7	33 $\pm$ 6***	1,4	2,4
12,5	25,5 $\pm$ 12	28,5 $\pm$ 8***	1,5	2,1
25	16,5 $\pm$ 7	21,5 $\pm$ 3	1,2	1,6
50	13 $\pm$ 2	25,5 $\pm$ 2***	1,0	1,9
100	23,5 $\pm$ 7	32,5 $\pm$ 4***	1,7	2,4
C +	37,5 $\pm$ 8***	30 $\pm$ 2***	2,8	2,2

**Tabela 16.** Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) da linhagem TA102 de *Salmonella typhimurium* exposta à diferentes concentrações do Neq0551 com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.  $p^* = 0,05$ ;  $p^{***} = 0,01$ .

Tratamentos ( $\mu\text{M}$ )	Número de poços revertentes (M $\pm$ DP)		Índice de mutagenicidade (IM)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
3,1	11 $\pm$ 2	24 $\pm$ 3	1,2	1,6
6,2	10,5 $\pm$ 2	24,5 $\pm$ 10	1,2	1,6
12,5	12 $\pm$ 5	21 $\pm$ 4	1,3	1,4
25	6,5 $\pm$ 2	19,5 $\pm$ 8	0,7	1,3

50	9,5 ± 2	25,5 ± 3	1,1	1,7
100	7,5 ± 4	20 ± 5	0,8	1,3
C +	22,5 ± 6***	30 ± 9*	2,5	2,0

**Tabela 17.** Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) da linhagem TA102 de *Salmonella typhimurium* exposta à diferentes concentrações de doxorubicina com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. p\*= 0,05; p\*\*\*= 0,01.

Tratamentos (µM)	Número de poços revertentes (M ± DP)		Índice de mutagenicidade (IM)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0,3	20 ± 9	44,5 ± 2***	1,4	2,6
06	21,5 ± 12	26,5 ± 9	1,5	1,6
1,2	14 ± 6	19 ± 4	1,0	1,1
2,5	18,5 ± 4	29 ± 10*	1,3	1,7
5	12 ± 3	43 ± 4***	0,9	2,5
10	13,5 ± 2	41 ± 3***	1,0	2,4
C +	42,5 ± 5***	37 ± 3***	3,0	2,1

**Tabela 18.** Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) da linhagem TA102 de *Salmonella typhimurium* exposta à diferentes concentrações de benzonidazol com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. p\*= 0,05; p\*\*\*= 0,01.

Tratamentos (µM)	Número de poços revertentes (M ± DP)		Índice de mutagenicidade (IM)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
3,1	20 ± 2*	37,5 ± 4***	2,5	2,2
6,2	16 ± 2*	29,5 ± 4*	2,0	1,7
12,5	16,5 ± 5*	26 ± 5	2,1	1,5
25	17 ± 5*	29 ± 8*	2,1	1,7
50	13 ± 2	36 ± 5***	1,6	2,1
100	16,5 ± 2*	22 ± 4	2,1	1,3
C +	37 ± 4***	34 ± 4***	4,6	2,1

A ativação metabólica com a adição da fração microsomal S9 não alterou a atividade mutagênica do benzonidazol, que também não foi dependente da concentração. O mesmo foi demonstrado por outros autores.<sup>114,165</sup> Buschini, A. e colaboradores viram que o benzonidazol é mais potente para substituição de pares de base do que para indução de *frameshift* em *S. typhimurium*, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho, visto que a linhagem TA102 detecta substituição do par AT. Além disso, o fármaco induziu danos ao DNA analisados por meio do ensaio Cometa e mostrou atuar principalmente por meio da geração de ROS.<sup>165</sup>

Por outro lado, os tratamentos com doxorrubicina e com Neq0438 induziram atividade mutagênica apenas com ativação metabólica, mostrando a importância da adição da fração microsomal.<sup>84</sup> A mutagenicidade da doxorrubicina já foi bem descrita na literatura utilizando o ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma.<sup>166,167,168,123,169</sup> Kostoryz, E. L. e Yourteeindica, D. M. utilizaram a linhagem TA102 de *S. Typhimurium* e reportaram o

mecanismo oxidativo na mutagenicidade de doxorubicina, mostrando que o Fe (III) é um elemento essencial nesse processo.<sup>123</sup> Além disso, estudos mostram que a doxorubicina também induz mutagenicidade em outras linhagens de *S. Typhimurium* (TA98, TA1538, TA100 e TA2637),<sup>168,123,169</sup> e em vários estudos a adição da fração S9 para a ativação metabólica não modifica a resposta mutagênica para as linhagens TA98 e TA1538.<sup>123,169,170</sup>

A linhagem TA102 contém um par de base AT no local da mutação em seu genoma, pelo qual detecta mutações de substituição. Diferente das outras linhagens de *S. typhimurium* mais utilizadas, a TA102 pode detectar uma variedade de mutagênicos oxidantes, incluindo raios-X, bleomicina, peróxido de hidrogênio, mitomicina C, entre outros.<sup>171,172</sup> Os danos oxidativos ao DNA são associados a diversas doenças, na qual a principal e mais discutida é o câncer. Porém, esses danos também estão envolvidos em outras doenças, como por exemplo, doenças neurodegenerativas e doenças relacionadas ao envelhecimento.<sup>173</sup>

Das espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila (OH•) reage com maior facilidade com o DNA por adição às duplas ligações das suas bases; e por abstração de um átomo de hidrogênio a partir do grupo metil da timina e de cada uma das ligações C-H da 2-desoxirribose. A adição à ligação dupla C5-C6 de pirimidinas forma principalmente radicais de aduto C5-OH e C6-OH e a abstração de átomos de hidrogênio de timinas resulta no radical alilo. Esses radicais são reduzidos ou oxidados dependendo de suas propriedades redox, ambiente redox e elementos da reação. A oxidação das purinas ocorre de forma similar, iniciando com a adição de OH• na posição C8, gerando como principais produtos os radicais 8-hidroxi-7,8-di-hidroguan-8-ilo e 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina para guanina, e os radicais 8-oxo-7,8-dihidroadenina e 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine para adenina. Se não fossem as defesas celulares, como antioxidantes de baixo peso molecular, antioxidantes enzimáticos e reparo do DNA, os níveis de tais bases modificadas por oxidação representariam rapidamente a maioria das bases no DNA.<sup>36,174</sup>

A partir desses resultados pode-se notar que o benzonidazol apresentou maior atividade mutagênica para a linhagem TA102 do que as outras substâncias testadas. Além disso, o Neq0551 não apresentou atividade mutagênica para esta linhagem. Porém, outros ensaios são necessários para confirmar os resultados negativos e também para assegurar que essas substâncias não interferem em outros processos, as quais podem ser avaliadas utilizando outras linhagens de *Salmonella typhimurium*, como por exemplo, as linhagens TA98 e TA100, que foram discutidas nesse trabalho.

## 5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

---

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ROS excede a capacidade das defesas antioxidantes presentes nas células, o que pode levar à modificações químicas e funcionais de macromoléculas, prejudicando a homeostase celular. O antiparasitário benzonidazol e o antineoplásico doxorrubicina causam estresse e danos oxidativos. Isto demonstrado para os fármacos de referência tanto em células sadias (linhagem de fibroblastos de camundongo - Balb/C 3T3 clone A31), quanto na linhagem de hepatocarcinoma (HepG2). No caso de Neq0438 e Neq0551, estudadas no grupo de pesquisa, não foi observado uma alteração na formação de ROS tal qual os fármacos. Além disso, tanto doxorrubicina quanto benzonidazol levaram à alterações maiores no sistema antioxidante enzimático comparados às substâncias Neq0438 e Neq0551, observado em qRT-PCR e Western blot, o que suporta os resultados obtidos no ensaio de detecção de ROS em HepG2.

A atividade mutagênica por dano oxidativo também foi avaliada através do ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma, utilizando a linhagem de *Salmonella typhimurium* TA102, que detecta mutações por danos oxidativos. Doxorrubicina e o Neq0438 apresentaram atividade mutagênica a partir da ativação metabólica, utilizando a fração microsomal S9, enquanto que o benzonidazol induziu atividade mutagênica com e sem ativação metabólica. O Neq0551 não apresentou atividade mutagênica. Logicamente, os resultados negativos não excluem por completo a possibilidade de mutagenicidade e outras linhagens de *Salmonella typhimurium* devem ser usadas para reduzir ainda mais a margem de erro.

Por fim, pode-se concluir que as substâncias em estudo pelo Grupo NEQUIMED induziram menor estresse oxidativo comparadas aos fármacos de referência benzonidazol e doxorrubicina. Essa afirmação é suportada pelos resultados obtidos no ensaio de detecção de ROS, na avaliação do sistema antioxidante enzimático e no ensaio de mutagenicidade. Desta forma, as substâncias apresentam um perfil mais seguro, que permite progredir os estudos com Neq0551 e Neq0438 em ensaios *in vivo*. Além disso, os resultados trazem novas informações sobre o perfil tóxico dos fármacos de referência.

Os ensaios futuros para caracterização mais aprofundada destas substâncias em relação ao estresse oxidativo podem incluir a análise do sistema antioxidante enzimático utilizando esferoides como cultura, já que até o momento essa análise foi feita em cultura de células 2D, além de estudos da atividade enzimática dessas proteínas antioxidantes.



## REFERÊNCIAS

1. Hay, M., Thomas, D. W., Craighead, J. L., Economides, C. & Rosenthal, J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol* (2014). doi:10.1038/nbt.2786
2. Munos, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nature Reviews Drug Discovery* (2009). doi:10.1038/nrd2961
3. Blomme, E. A. G. & Will, Y. Toxicology Strategies for Drug Discovery: Present and Future. *Chemical Research in Toxicology* (2016). doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00407
4. Blomme, E. A. G., Yang, Y. & Waring, J. F. Use of toxicogenomics to understand mechanisms of drug-induced hepatotoxicity during drug discovery and development. *Toxicology Letters* (2009). doi:10.1016/j.toxlet.2008.09.017
5. Hornberg, J. J. *et al.* Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how. *Drug Discovery Today* (2014). doi:10.1016/j.drudis.2013.12.008
6. NAS. *Application of Modern Toxicology Approaches for Predicting Acute Toxicity for Chemical Defense*. National Academies Press (2015). doi:10.17226/21775
7. Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Coppa, A. & Roda, A. Cell-based assays: Fuelling drug discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2010). doi:10.1007/s00216-010-3933-z
8. Hopkins, A. L. & Bickerton, G. R. Drug discovery: Know your chemical space. *Nature Chemical Biology* (2010). doi:10.1038/nchembio.395
9. Allen, D. D. *et al.* Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2005). doi:10.1080/03639040500216246
10. Zang, R., Li, D., Tang, I.-C., Wang, J. & Yang, S.-T. Cell-Based Assays in High-

- Throughput Screening for Drug Discovery. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* (2012). doi:10.6000/1927-3037.2012.01.01.02
11. Sundberg, S. A. High-throughput and ultra-high-throughput screening: Solution- and cell-based approaches. *Current Opinion in Biotechnology* (2000). doi:10.1016/S0958-1669(99)00051-8
  12. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* (2014). doi:10.1089/adt.2014.573
  13. Wen, Y. & Yang, S.-T. The future of microfluidic assays in drug development. *Expert Opin. Drug Discov.* (2008). doi:10.1517/17460441.3.10.1237
  14. Yang, S.-T., Zhang, X. & Wen, Y. Microbioreactors for high-throughput cytotoxicity assays. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* (2008).
  15. Rossini, G. P. & Hartung, T. Food for thought... towards tailored assays for cell-based approaches to toxicity testing. *ALTEX* (2012). doi:10.14573/altex.2012.4.359
  16. Article, R. & Poteser, M. [Biomonitoring] Cell-based in vitro models in environmental toxicology a review. 11–26 (2017).
  17. Schafer, F. Q. & Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* (2001). doi:10.1016/S0891-5849(01)00480-4
  18. Zitka, O. *et al.* Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol. Lett.* (2012). doi:10.3892/ol.2012.931
  19. Kohen, R. & Nyska, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* (2002). doi:10.1080/01926230290166724

20. Sies, H. & Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (1985). doi:10.1098/rstb.1985.0168
21. Han, D., Hanawa, N., Saberi, B. & Kaplowitz, N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (2006). doi:10.1152/ajpgi.00001.2006
22. Fernandes, A. S. *et al.* Role of the Copper(II) Complex Cu[15]pyN5 in Intracellular ROS and Breast Cancer Cell Motility and Invasion. *Chem. Biol. Drug Des.* (2015). doi:10.1111/cbdd.12521
23. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* (2006). doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
24. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* (1994). doi:10.1016/S0140-6736(94)92211-X
25. Cheeseman, K. H. & Slater, T. F. An Introduction to Free-Radical Biochemistry. *Br. Med. Bull.* (1993).
26. Simic, M. G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (1988). doi:10.1016/0027-5107(88)90199-6
27. Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E. & Brenowitz, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in mechanism of sequence-specific binding. *J. Mol. Biol.* (2000). doi:10.1006/jmbi.2000.4173
28. Ajuwon, O. R., Marnewick, J. L. & Davids, L. M. Rooibos (*Aspalathus linearis*) and its Major Flavonoids — Potential Against Oxidative Stress-Induced Conditions. in *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress* (2015). doi:10.5772/61614
29. Beckman, K. B. & Ames, B. N. Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry* (1997). doi:10.1074/jbc.272.32.19633

30. Stowe, D. F. & Camara, A. K. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. *Antioxid. Redox Signal.* (2009). doi:10.1089/ars.2008.2331
31. Stadtman, E. R. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.* (1986). doi:10.1016/0968-0004(86)90221-5
32. Levine, R. L. & Stadtman, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol* (2001). doi:S0531-5565(01)00135-8 [pii]
33. Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K. J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* (1997). doi:10.1074/jbc.271.26.15504
34. Davies, K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* (1987).
35. Rajneesh, C. P., Manimaran, a, Sasikala, K. R. & Adaikappan, P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med. J.* (2008). doi:10.1002/cbf.1308
36. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* (2003). doi:10.1096/fj.02-0752rev
37. Droge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* (2002). doi:10.1152/physrev.00018.2001
38. Engelhardt, J. F. Redox-mediated gene therapies for environmental injury: approaches and concepts. *Antioxid Redox Signal* (1999). doi:10.1089/ars.1999.1.1-5
39. Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K. & Paules, R. S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* (2000). doi:S0891-5849(00)00224-0 [pii]

40. Sen, C. K. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochemical Pharmacology* (1998). doi:10.1016/S0006-2952(97)00672-2
41. Gutteridge, J. M., Quinlan, G. J. & Kovacic, P. Phagomimetic action of antimicrobial agents. *Free Radic. Res.* (1998). doi:10.3109/10715769809097871
42. Egan, R. W. & Kuehl, F. A. Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* (1980). doi:6254151
43. Wolin, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2000). doi:10.1161/01.ATV.20.6.1430
44. Atamna, H., Cheung, I. & Ames, B. N. A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000). doi:10.1073/pnas.97.2.686
45. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. & Rodriguez, H. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* (2002). doi:10.1016/S0891-5849(02)00826-2
46. Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors* (1997). doi:10.1002/biof.5520060404
47. Kurata, M., Suzuki, M. & Agar, N. S. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Physiology* (1993). doi:10.1016/0305-0491(93)90121-K
48. Kohen, R. Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (1999). doi:10.1016/S0753-3322(99)80087-0
49. Kohen, R. & Gati, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. in *Toxicology* (2000). doi:10.1016/S0300-483X(00)00206-7

50. Mates, J. M., Perez-Gomez, C. & Nunez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* (1999). doi:S0009912099000752 [pii]
51. Zelko, I. N., Mariani, T. J. & Folz, R. J. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* (2002). doi:10.1016/S0891-5849(02)00905-X
52. Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y. & Zheng, X. F. S. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun* (2014). doi:10.1038/ncomms4446
53. Turrens, J. F., Crapo, J. D. & Freeman, B. A. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* (1984). doi:10.1172/JCI111210
54. Glorieux, C. & Calderon, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry* (2017). doi:10.1515/hsz-2017-0131
55. Sun, Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* (1990). doi:10.1016/0891-5849(90)90156-D
56. Matés, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* (2000). doi:10.1016/S0300-483X(00)00306-1
57. Dietz, K. J., Horling, F., König, J. & Baier, M. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J. Exp. Bot.* (2002). doi:10.1093/jexbot/53.372.1321
58. Song, I. S. *et al.* Mitochondrial peroxiredoxin III is a potential target for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* (2011). doi:10.3390/ijms12107163
59. Wood, Z. A., Schroder, E., Harris, J. R. & Poole, L. B. Structure, mechanism and

- regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* (2003). doi:Pii S0968-0004(02)00003-8
60. Aoyama, K. & Nakaki, T. Glutathione in cellular Redox homeostasis: Association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Molecules* (2015). doi:10.3390/molecules20058742
  61. Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A. & Flaherty, D. M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: Comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* (1999). doi:10.1016/S0891-5849(99)00061-1
  62. Wang, H. & Joseph, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* (1999). doi:10.1016/S0891-5849(99)00107-0
  63. Lautraite, S., Bigot-Lasserre, D., Bars, R. & Carmichael, N. Optimisation of cell-based assays for medium throughput screening of oxidative stress. *Toxicol. Vitr.* (2003). doi:10.1016/S0887-2333(03)00005-5
  64. Aula, S. *et al.* Biophysical, biopharmaceutical and toxicological significance of biomedical nanoparticles. *RSC Adv.* (2015). doi:10.1039/C5RA05889A
  65. Kalyanaraman, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* (2012). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
  66. Kotamraju, S. *et al.* Nitric oxide inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced transferrin receptor-dependent apoptosis in endothelial cells: Role of ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2003). doi:10.1073/pnas.1933581100
  67. Kotamraju, S. *et al.* Oxidant-Induced Iron Signaling in Doxorubicin-Mediated Apoptosis. *Methods Enzymol.* (2004). doi:10.1016/S0076-6879(04)78026-X

68. Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E. & Frennesson, C. I. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.* (2010). doi:10.1042/BJ20100208
69. Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R. & DeMarini, D. M. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (2007). doi:10.1016/j.mrrev.2007.09.001
70. Lynch, A. M. *et al.* New and emerging technologies for genetic toxicity testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (2011). doi:10.1002/em.20614
71. Benigni, R., Bossa, C., Tcheremenskaia, O. & Giuliani, A. Alternatives to the carcinogenicity bioassay: in silico methods, and the in vitro and in vivo mutagenicity assays. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* (2010). doi:10.1517/17425255.2010.486400
72. Brown TA. *Genomes. 2nd edition. Chapter 14, Mutation, Repair and Recombination. Available from Mutation, Repair and Recombination.* (2002).
73. Anthony JF Griffiths, Jeffrey H Miller, David T Suzuki, Richard C Lewontin, and W. M. G. *An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition. ISBN* (2000).
74. Friedberg, E. C. A brief history of the DNA repair field. *Cell Res.* (2008). doi:10.1038/cr.2007.113
75. Slupphaug, G., Kavli, B. & Krokan, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. in *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (2003). doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002
76. Clancy, S. (2008) D. D. & R. M. for M. D. I. DNA Damage & Repair: Mechanisms for Maintaining DNA Integrity. *Nat. Educ.* (2008). doi:10.1038/nrm2351.pdf
77. Ames, B. N., McCann, J. & Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*

- Mutagen. Relat. Subj.* (1975). doi:10.1016/0165-1161(75)90046-1
78. Zeiger, E. Historical perspective on the development of the genetic toxicity test battery in the United States. *Can. J. Psychiatry* (2005). doi:10.1002/em.20602
79. Bessems, J. G. *et al.* PBTK modelling platforms and parameter estimation tools to enable animal-free risk assessment. Recommendations from a joint EPAA - EURL ECVAM ADME workshop. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* (2014). doi:10.1016/j.yrtph.2013.11.008
80. Thybaud, V. *et al.* Main issues addressed in the 2014–2015 revisions to the OECD Genetic Toxicology Test Guidelines. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (2017). doi:10.1002/em.22079
81. Food. International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice. *Fed. Regist.* (2012).
82. Maron, D. M. & Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* (1983). doi:10.1016/0165-1161(83)90010-9
83. Cox, J. A., Fellows, M. D., Hashizume, T. & White, P. A. The utility of metabolic activation mixtures containing human hepatic post-mitochondrial supernatant (S9) for in vitro genetic toxicity assessment. *Mutagenesis* (2016). doi:10.1093/mutage/gev082
84. Richardson, S. J., Bai, A., Kulkarni, A. A. & Moghaddam, M. F. Efficiency in Drug Discovery: Liver S9 Fraction Assay As a Screen for Metabolic Stability. *Drug Metab. Lett.* (2016). doi:10.2174/1872312810666160223121836
85. Gatehouse, D. *et al.* Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* (1994). doi:10.1016/0165-1161(94)90037-X
86. Bridges, B. A. The fluctuation test. *Arch. Toxicol.* (1980). doi:10.1007/BF00361244

87. Mortelmans, K. & Zeiger, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **455**, 29–60 (2000).
88. Flückiger-Isler, S. *et al.* Assessment of the performance of the Ames II<sup>TM</sup> assay: A collaborative study with 19 coded compounds. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* (2004). doi:10.1016/j.mrgentox.2003.12.001
89. Kamber, M., Flückiger-Isler, S., Engelhardt, G., Jaekch, R. & Zeiger, E. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis* (2009). doi:10.1093/mutage/gep017
90. Flückiger-Isler, S. & Kamber, M. The Ames II and Ames MPF Penta I Assay: A Liquid Microplate Format Modification of the Classic Ames Test. in *Genotoxicity and DNA repair* (2014). doi:10.1007/978-1-4939-1068-7\_2
91. Hengstler, J. G. & Oesch, F. Ames test. in *elsevier* (2001).
92. McCann, J. & Ames, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1976). doi:10.1073/pnas.73.3.950
93. Malaveille, C., Brun, G. & Bartsch, H. Studies on the efficiency of the salmonella/rat hepatocyte assay for the detection of carcinogens as mutagens: Activation of 1,2-dimethyl-hydrazine and procarbazine into bacterial mutagens. *Carcinogenesis* (1983). doi:10.1093/carcin/4.4.449
94. Bogen, K. T. Improved prediction of carcinogenic potencies from mutagenic potencies for chemicals positive in rodents and the ames test. *Environ. Mol. Mutagen.* (1995). doi:10.1002/em.2850250107
95. Kumar, A. & Dhawan, A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: An update. *Archives of Toxicology* (2013). doi:10.1007/s00204-013-1128-z

96. Avelar, L. A. A. *et al.* Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, 1–24 (2015).
97. Burtoloso, A. C. B. *et al.* Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2017). doi:10.1371/journal.pntd.0005343
98. Saidel, M. É., dos Santos, K. C., Nagano, L. F. P., Montanari, C. A. & Leitão, A. Novel anti-prostate cancer scaffold identified by the combination of in silico and cell-based assays targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* (2017). doi:10.1016/j.bmcl.2017.07.061
99. Sudhan, D. R. & Siemann, D. W. Cathepsin L targeting in cancer treatment. *Pharmacol. Ther.* (2015). doi:10.1016/j.pharmthera.2015.08.007
100. Souto-Padrón, T., Campetella, O. E., Cazzulo, J. J. & de Souza, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell Sci.* (1990).
101. Doyle, P. S. *et al.* The *trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. *PLoS Pathog.* (2011). doi:10.1371/journal.ppat.1002139
102. Andrade, D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: A converging pathway leading to chagasic vasculopathy. *Br. J. Pharmacol.* (2012). doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01609.x
103. Populo, H., Lopes, J. M. & Soares, P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* (2012). doi:10.3390/ijms13021886
104. Gomez-Pinillos, A. & Ferrari, A. C. MTOR Signaling Pathway and mTOR Inhibitors in Cancer Therapy. *Hematology/Oncology Clinics of North America* (2012). doi:10.1016/j.hoc.2012.02.014

105. de Andrade, J. P. *et al.* I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of chagas' heart disease. Executive summary. *Arq. Bras. Cardiol.* (2011). doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2011000600002>
106. Patterson, S. & Wyllie, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology* (2014). doi:10.1016/j.pt.2014.04.003
107. Perez-Molina, J. A. *et al.* Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* (2009). doi:10.1093/jac/dkp357
108. Maya, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (2007). doi:10.1016/j.cbpa.2006.03.004
109. Cançado, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* (2002). doi:10.1590/S0036-46652002000100006
110. Viotti, R. *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: Fears and realities. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* (2009). doi:10.1586/14787210.7.2.157
111. Rendon, D. A. Alterations of mitochondria in liver but not in heart homogenates after treatment of rats with benznidazole. *Hum. Exp. Toxicol.* (2014). doi:10.1177/0960327114521050
112. Coura, J. R. & De Castro, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (2002). doi:10.1590/S0074-02762002000100001
113. Walton, M. I., Bleehen, N. M. & Workman, P. Stimulation by Localized Tumor Hyperthermia of Reductive Bioactivation of 2-Nitroimidazole Benznidazole in Mice. *Cancer Res.* (1989).

114. Melo, Maria Eliane B.; Ferreira, L. C. S. Screening the mutagenic activities of commonly used antiparasite drugs by the simultest, a simplified Salmonella/microsome plate incorporation assay. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* (1990).
115. Teixeira, A. R. L., Cordoba, J. C., Maior, I. S. & Solorzano, E. Chagas' disease: Lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1990). doi:10.4269/ajtmh.1990.43.146
116. Santos, S. J., Takahashi, C. S. & Natarajan, A. T. Cytogenetic effects of the antichagasic benznidazole on human cells in vitro. *Mutat. Res. Toxicol.* (1994). doi:10.1016/0165-1218(94)90083-3
117. Thorn, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* (2011). doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56
118. Senchenkov, A., Litvak, D. A. & Cabot, M. C. Targeting Ceramide Metabolism—a Strategy for Overcoming Drug Resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* (2001). doi:10.1093/jnci/93.5.347
119. Octavia, Y. *et al.* Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (2012). doi:10.1016/j.yjmcc.2012.03.006
120. Šimůnek, T. *et al.* Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. in *Pharmacological Reports* (2009). doi:10.1016/S1734-1140(09)70018-0
121. Singal, P. K., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I. & Iliskovic, N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol. Cell. Biochem.* (2000). doi:10.1023/A:1007094214460
122. Leite-Silva, C., Gusmão, C. L. S. & Takahashi, C. S. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Fucus vesiculosus* extract on cultured human lymphocytes using the chromosome aberration and Comet assays. *Genet. Mol. Biol.* (2007). doi:10.1590/S1415-47572007000100019

123. Cebula, T. A. Genetic and physiological modulation of anthracycline-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mutagen.* (1986). doi:10.1002/em.2860080504
124. Menna, P., Minotti, G. & Salvatorelli, E. In vitro modeling of the structure-activity determinants of anthracycline cardiotoxicity. in *Cell Biology and Toxicology* (2007). doi:10.1007/s10565-006-0143-8
125. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* (2001). doi:10.1006/meth.2001.1262
126. Tsang, W. P., Chau, S. P. Y., Kong, S. K., Fung, K. P. & Kwok, T. T. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci.* (2003). doi:10.1016/S0024-3205(03)00566-6
127. Novaes, R. D. *et al.* Trypanosoma cruzi infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. *Parasitol. Res.* (2015). doi:10.1007/s00436-015-4488-x
128. Pedrosa, R. C. *et al.* Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep.* (2001). doi:10.1179/135100001101536328
129. Zhou, S., Palmeira, C. M. & Wallace, K. B. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol. Lett.* (2001). doi:10.1016/S0378-4274(01)00329-0
130. Martignoni, M., Groothuis, G. M. M. & de Kanter, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* (2006). doi:10.1517/17425255.2.6.875
131. Guengerich, F. P. CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1999). doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.1
132. Westerink, W. M. A. & Schoonen, W. G. E. J. Cytochrome P450 enzyme levels in

- HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. Vitro.* (2007). doi:10.1016/j.tiv.2007.05.014
133. Sormunen, R., Eskelinen, S. & Lehto, V. P. Bile canaliculus formation in cultured HEPG2 cells. *Lab Invest* (1993).
  134. Miret, S., Groene, E. De & Klaffke, W. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. *J. Biomol. Screen.* (2006). doi:10.1177/1087057105283787
  135. Jennen, D. G. J. *et al.* Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicol. Sci.* (2010). doi:10.1093/toxsci/kfq026
  136. Rigalli, J. P. *et al.* The antitripanocide benznidazole promotes adaptive response to oxidative injury: Involvement of the nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) and multidrug resistance associated protein 2 (MRP2). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **304**, 90–98 (2016).
  137. Panchuk, R. R. *et al.* Rapid generation of hydrogen peroxide contributes to the complex cell death induction by the angucycline antibiotic landomycin E. *Free Radic. Biol. Med.* (2017). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.024
  138. Farhane, Z. *et al.* Differentiating responses of lung cancer cell lines to Doxorubicin exposure: in vitro Raman micro spectroscopy, oxidative stress and bcl-2 protein expression. *J. Biophotonics* (2017). doi:10.1002/jbio.201600019
  139. Roegner, A. F. & Puschner, B. Aggregate culture: A more accurate predictor of microcystin toxicity for risk assessment. *Toxicon* (2014). doi:10.1016/j.toxicon.2014.02.017
  140. Wartenberg, M., Schallenberg, M., Hescheler, J. & Sauer, H. Reactive oxygen species-mediated regulation of eNOS and iNOS expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Int. J. Cancer* (2003). doi:10.1002/ijc.10928

141. Szatrowski, T. P. & Nathan, C. F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* (1991).
142. Chang, T. T. & Hughes-Fulford, M. Monolayer and Spheroid Culture of Human Liver Hepatocellular Carcinoma Cell Line Cells Demonstrate Distinct Global Gene Expression Patterns and Functional Phenotypes. *Tissue Eng. Part A* (2009). doi:10.1089/ten.tea.2007.0434
143. Mueller, D., Koetemann, A. & Noor, F. Organotypic Cultures of Hepg2 Cells for In Vitro Toxicity Studies. *J. Bioeng. Biomed. Sci.* (2011). doi:10.4172/2155-9538.S2-002
144. Sauer, H., Pütz, V., Fischer, K., Hescheler, J. & Wartenberg, M. Increased doxorubicin uptake and toxicity in multicellular tumour spheroids treated with DC electrical fields. *Br. J. Cancer* (1999). doi:10.1038/sj.bjc.6690487
145. Stanimirovic, D. B., Wong, J., Ball, R. & Durkin, J. P. Free radical-induced endothelial membrane dysfunction at the site of blood-brain barrier: Relationship between lipid peroxidation, Na,K-ATPase activity, and <sup>51</sup>Cr release. *Neurochem. Res.* (1995). doi:10.1007/BF00970589
146. Wartenberg, M. *et al.* Glycolytic pyruvate regulates P-glycoprotein expression in multicellular tumor spheroids via modulation of the intracellular redox state. *J. Cell. Biochem.* (2010). doi:10.1002/jcb.22422
147. Schulte, J. Peroxiredoxin 4: A multifunctional biomarker worthy of further exploration. *BMC Medicine* (2011). doi:10.1186/1741-7015-9-137
148. Sagara, Y. *et al.* Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* (1998).
149. Szwed, M., Kania, K. D. & Jozwiak, Z. Changes in the activity of antioxidant barrier after treatment of K562 and CCRF-CEM cell lines with doxorubicin-transferrin conjugate. *Biochimie* (2014). doi:10.1016/j.biochi.2014.10.005
150. Szwed, M., Wrona, D., Kania, K. D., Koceva-Chyla, A. & Marczak, A. Doxorubicin-

- transferrin conjugate triggers pro-oxidative disorders in solid tumor cells. *Toxicol. Vitro*. (2016). doi:10.1016/j.tiv.2015.11.009
151. Injac, R. *et al.* Potential hepatoprotective effects of fulleranol C60(OH)24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. *Biomaterials* (2008). doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.048
  152. Pieniżek, A., Czepas, J., Piasecka-Zelga, J., Gwoździński, K. & Koceva-Chyła, A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Adv. Med. Sci.* (2013). doi:10.2478/v10039-012-0063-1
  153. McDonald, C., Muhlbauer, J., Perlmutter, G., Taparra, K. & Phelan, S. A. Peroxiredoxin proteins protect MCF-7 breast cancer cells from doxorubicin-induced toxicity. *Int. J. Oncol.* (2014). doi:10.3892/ijo.2014.2398
  154. Nicolussi, A., D'inzeo, S., Capalbo, C., Giannini, G. & Coppa, A. The role of peroxiredoxins in cancer (Review). *Mol. Clin. Oncol.* (2017). doi:10.3892/mco.2017.1129
  155. Wang, T., Diaz, A. J. G. & Yen, Y. The role of peroxiredoxin II in chemoresistance of breast cancer cells. *Breast Cancer: Targets and Therapy* (2014). doi:10.2147/BCTT.S61281
  156. Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W. & Rhee, S. G. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* (1999). doi:10.1016/S0168-8227(99)00037-6
  157. Bertoldi, M. Human Peroxiredoxins 1 and 2 and Their Interacting Protein Partners; Through Structure Toward Functions of Biological Complexes. *Protein Pept. Lett.* (2015). doi:10.2174/0929866523666151106123720
  158. Day, A. M. *et al.* Inactivation of a Peroxiredoxin by Hydrogen Peroxide Is Critical for Thioredoxin-Mediated Repair of Oxidized Proteins and Cell Survival. *Mol. Cell* (2012). doi:10.1016/j.molcel.2011.11.027

159. Kang, Y. J., Sun, X., Chen, Y. & Zhou, Z. Inhibition of doxorubicin chronic toxicity in catalase-overexpressing transgenic mouse hearts. *Chem. Res. Toxicol.* (2002). doi:10.1021/tx015532n
160. Hajra, S., Basu, A., Singha Roy, S., Patra, A. R. & Bhattacharya, S. Attenuation of doxorubicin-induced cardiotoxicity and genotoxicity by an indole-based natural compound 3,3'-diindolylmethane (DIM) through activation of Nrf2/ARE signaling pathways and inhibiting apoptosis. *Free Radic. Res.* (2017). doi:10.1080/10715762.2017.1381694
161. Anghel, N. *et al.* Acute cardiotoxicity induced by doxorubicin in right ventricle is associated with increase of oxidative stress and apoptosis in rats. *Histol. Histopathol.* 11932 (2017). doi:10.14670/HH-11-932
162. Keene, J. D. RNA regulons: Coordination of post-transcriptional events. *Nature Reviews Genetics* (2007). doi:10.1038/nrg2111
163. Goodson-Gregg, N. & De Stasio, E. A. Reinventing the ames test as a quantitative lab that connects classical and molecular genetics. *Genetics* (2009). doi:10.1534/genetics.108.095588
164. Mathur, N., Bhatnagar, P. & Bakre, P. Assessing mutagenicity of textile dyes from pali (Rajasthan) using ames bioassay. *Appl. Ecol. Environ. Res.* (2006). doi:10.15666/aeer/0401\_111118
165. Buschini, A. *et al.* Genotoxicity Revaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. *J. Parasitol. Res.* (2009). doi:10.1155/2009/463575
166. Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F. & Ames, B. N. [29] Detection of Oxidative Mutagens with a New Salmonella Tester Strain (TA102). *Methods Enzymol.* (1984). doi:10.1016/S0076-6879(84)05032-1
167. De Flora, S., Camoirano, A., D'Agostini, F. & Balansky, R. Modulation of the mutagenic response in prokaryotes. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* (1992). doi:10.1016/0027-5107(92)90062-7

168. Benedicl, W. F., Baker, M. S. & Ames, B. N. Mutagenicity of Cancer Chemotherapeutic Agents in the Salmonella/Microsome Test. *Cancer Res.* (1977).
169. Yourtee, D. M., Elkins, L. L., Nalvarte, E. L. & Smith, R. E. Amplification of doxorubicin mutagenicity by cupric ion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1992). doi:10.1016/0041-008X(92)90144-H
170. Sinha, B. K., Mimnaugh, E. G., Trush, M. A. & Kennedy, K. A. Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear dna. *Cancer Res.* (1984).
171. Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A. & Ames, B. N. A new Salmonella tester strain (TA102) with AT base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Genetics* **79**, 7445–7449 (1982).
172. Ruiz-Rubio, M., Alejandro-Durán, E. & Pueyo, C. Oxidative mutagens specific for A·T base pairs induce forward mutations to L-arabinose resistance in Salmonella typhimurium. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* (1985). doi:10.1016/0165-1161(85)90053-6
173. Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Cooke, M. S. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (2004). doi:10.1016/j.mrrev.2003.11.001
174. Cadet, J. & Wagner, J. R. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2013). doi:5/2/a012559 [pii]\r10.1101/cshperspect.a012559 [doi]



## ANEXOS

**Anexo A.** Apresentação da concentração ideal de cada par de primer determinada durante a padronização e eficiência de reação para cada gene alvo.

Gene de interesse	Concentração ideal	Eficiência da reação
PRDX1	300F/300R nM	95,439 %
PRDX2	300F/300R nM	95,195 %
PRDX3	100F/300R nM	107,98 %
PRDX4	300F/150R nM	106,72 %
PRDX5	100F/100R nM	96,10 %
PRDX6	100F/100R nM	98,96 %
$\beta$ ACTINA	300F/150R nM	97,22 %
CATALASE	150F/300R nM	101,92 %
SOD-1	150F/150R	95,94 %
GPX	300F/150R nM	96,57 %

**Anexo B.** Sequência dos *primers* que foram utilizados para o qRT-PCR.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
PRDX1F	TGTAAATGACCTCCCTGTTGG
PRDX1R	TATCACTGCCAGGTTTCCAG
PRDX2F	CTGTTAATGATTTGCCTGTGGG
PRDX2R	TGGGCTTAATCGTGTCACTG
PRDX3F	TCCCACTTTAGCCATCTTGC
PRDX3R	GTAGTCTCGGGAAATCTGCTTAG
PRDX4F	ATCAGATCTCAAAGGACTATGGTG
PRDX4R	CCAAACGTAGTGTCTCATCCAC
PRDX5F	AGAAGGGTGTGCTGTTTGG
PRDX5R	TCATTAACACTCAGACAGGCC
PRDX6F	CACGACTTTCTGGGAGACT
PRDX6R	GGGCAATCAACTTAACATTCCTC
$\beta$ ACTINA - F	AGGCCAACCGCGAGAAG
$\beta$ ACTINA - R	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA
CATALASE – F	TGAATGAGGAACAGAGGAAACG
CATALASE – R	GTACTIONTGTCCAGAAGAGCCTG
SOD – F	GGGCAAAGGTGGAAATGAAG
SOD – R	CAGCTAGCAGGATAACAGATGAG
GPX – F	TTCCAGACCATTGACATCGAG
GPX – R	CACCCTCATAGATGAAAACCCC