



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

DALLIANE MACEDO LOPES DE OLIVEIRA

**EFEITO ANTIMITÓTICO DE UM DERIVADO DE PIRIMIDINONA NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE OURIÇOS-DO-MAR.**

JOÃO PESSOA – PARAÍBA

2015

DALLIANE MACEDO LOPES DE OLIVEIRA

**EFEITO ANTIMITÓTICO DE UM DERIVADO DE PIRIMIDINONA NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE OURIÇOS-DO-MAR.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular da
Universidade Federal da Paraíba, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de MESTRE
EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, área de
concentração: BIOLOGIA E FISILOGIA
CELULAR.**

**Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos
ORIENTADOR**

**JOÃO PESSOA – PARAÍBA
2015**

DALLIANE MACEDO LOPES DE OLIVEIRA

EFEITO ANTIMITÓTICO DE UM DERIVADO DE PIRIMIDINONA NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE OURIÇOS-DO-MAR.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos (**ORIENTADOR**)
(Departamento de Biologia Molecular – UFPB)

Prof. Dr. José Antônio Novaes da Silva (Examinador Externo)
(Departamento de Biologia Molecular – UFPB)

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior (Examinador Interno)
(Departamento de Biologia Molecular – UFPB)

JOÃO PESSOA – PARAÍBA
2015

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos, pela paciência, pelo incentivo constante, pela insistência e determinação em me mostrar a importância de se dedicar ao que se escolhe fazer, e, principalmente, por não desistir de mim e acreditar em minha capacidade. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos e sempre o levarei como um grande exemplo de homem;

Aos membros da Banca Examinadora, Prof. Dr. Siqueira e Prof. José Antônio, por todo carinho dado ao longo dessa caminhada e, principalmente, pelas valiosas contribuições para o aprimoramento desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura por ter cedido, gentilmente, o composto estudado, contribuindo para a realização deste trabalho;

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha, por conduzir brilhantemente o Programa junto com a secretária da Pós-Graduação, Ludmilla Maul, a qual sempre estive à disposição para nos auxiliar, com muita dedicação e eficiência;

Ao Departamento de Biologia Molecular (DBM) e a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por disponibilizar a infraestrutura necessária para a realização desta pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e suporte técnico por meio do Portal Periódicos;

Aos funcionários do DBM: Seu Moreira, Dona Severina, Dona Regina e Dona Geralda, pelo carinho sempre demonstrado; Em especial, a Antônio Bosco, pelo apoio, carinho, atenção indispensáveis e preciosos em nosso dia-a-dia;

Aos meus queridos amigos e companheiros do LABID: Thaís, Raianna e Thyago, pelo apoio, incentivo e ajuda mútua, fatores indispensáveis para a realização de nossos trabalhos;

Aos integrantes do LABIPI: Fernando, Natan, Sâmia e Jaíse, que compartilharam por tanto tempo o mesmo ambiente de trabalho de forma amigável e prestativa; e à Profa. Dra. Mirella, pelo apoio e carinho prestados;

Aos meus amigos de turma de mestrado: Natalina, Rayssa, Halinne, Giuseppe Gianinni, Rayner e Roberta, pela valiosa companhia em toda essa trajetória, pelo incentivo mútuo e crescimento diário compartilhados;

À minha família amada e abençoada: meus pais queridos, Cleto e Patrícia, pelo amor incondicional dado em toda minha vida, por não terem medido esforços em prol do meu crescimento, por terem suportado e entendido minha ausência, no período que em residi em João Pessoa, sempre me dando a atenção, apoio, amor e carinho imensuráveis; à minha querida irmã Cibelly por todo amor e atenção prestados à seu modo peculiar de ser; à minha pequena querida Belinha, pela companhia 24 horas ao meu lado nessa reta final do curso, sempre mostrando seu carinho e amor incondicionais; ao querido Elias pelo apoio e ensinamentos, principalmente científicos, prestados por todo esse tempo em nossas vidas; e aos meus demais familiares: tios, tias e primas, por acrescentarem e abrilhantarem ainda mais esse amor familiar, o qual é tão sublime;

Aos meus queridos amigos: minha “filha” amada Jéssica, por sempre ter acreditado e confiado em mim, em todos os momentos de nossas vidas, me transmitindo carinho e apoio imensos; aos queridos Lenilton, Gustavo e Jovelina, por terem me incentivado em todo o momento de fraqueza e por terem vibrado em todos os momentos de conquistas; aos amigos que fiz em João Pessoa, Sandro e Edilza, que me deram tanto incentivo e apoio; à minha eterna amiga-mãe paraibana Lucemar, por toda a atenção, generosidade e carinho prestados. Ao amigo Jocelmo, exemplo de homem e cristão, que me passou ensinamentos que levarei para o resto de minha vida; e à minha amiga do coração Andrezza, por tudo o que ela representa

para mim, exemplo de determinação e superação, uma menina-mulher que me deu muito apoio e carinho.

E, por fim, ao querido Deus, que me deu o dom da vida e, principalmente, nunca desistiu de mim, me resgatando em momentos de fraqueza e me mostrando a cada dia que “tudo posso naquele que me fortalece”.

Resumo

RESUMO

O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células de um determinado tecido, que invadem e comprometem, funcionalmente, células sãs do organismo. A quimioterapia é o principal tratamento do câncer, consistindo na administração de drogas que interferem em diversas vias metabólicas, ocasionando a morte celular. Dentre os principais quimioterápicos, os antimitóticos são drogas que afetam, diretamente, a divisão celular. O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antimitótica de um derivado de pirimidinona (Py-09) no desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. Animais adultos foram coletados na costa João Pessoa, Paraíba, Brasil, mantidos em água do mar filtrada sob fluxo de ar constante. Os gametas foram coletados por injeção intracelomática de KCl. Os gametas ou embriões foram tratados com Py-09 e foi analisada a atividade do composto sobre a fertilização, o desenvolvimento embrionário, o potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$), a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a atividade de transportadores ABC. O Py-09 (12,5 μM) inibiu, em cerca de 60%, a fertilização de óvulos previamente tratados com o composto. No entanto, o tratamento dos espermatozoides com o Py-09 não afetou a taxa de fertilização. O tratamento dos zigotos com o Py-09 inibiu o desenvolvimento embrionário inicial, apresentando um efeito antimitótico dose e tempo-dependente, atingindo um efeito máximo na concentração de 50 μM ($\text{CE}_{50} = 12,5 \mu\text{M}$). Foram observadas alterações morfológicas no padrão de clivagem dos embriões (clivagem desigual) e em estágios larvais (distribuição irregular e fissuras das espículas e extravasamento de células pigmentares). O tratamento com Py-09 promoveu a perda do $\Delta\Psi_m$, sem, entretanto, alterar os níveis intracelulares de ROS. O ensaio com os inibidores dos transportadores ABCB1 e ABCC1 (Reversina 205 e MK571, respectivamente) mostrou que o Py-09 não é substrato de proteínas ABC. Por outro lado, o ensaio de acúmulo intracelular de calceína e os ensaios de associação do Py-09 com a vimblastina demonstraram que o mesmo não reverte o fenômeno MXR, uma vez que o composto não foi capaz de aumentar os níveis de fluorescência intracelular da calceína, e a associação Py-09 (12,5 μM)/vimblastina (100 e 400 nM) apresentou o mesmo efeito inibitório da vimblastina *per se*. Em suma, o presente trabalho demonstrou que o Py-09 apresenta uma marcante atividade antimitótica, acarretando alterações tanto na morfologia quanto na fisiologia celular. Estudos adicionais são necessários para um maior entendimento do mecanismo de ação do composto, e para a investigação acerca do potencial do Py-09 como ferramenta farmacológica para estudos *in vitro*, assim como para o seu uso terapêutico.

Palavras-chave: antimitótico; pirimidinona; fertilização; desenvolvimento embrionário; divisão celular.

Abstract

ABSTRACT

Cancer is characterized by uncontrolled cell growth of a particular tissue, which invades and impairs healthy cells functions. Chemotherapy is the main cancer treatment, and consists of drug administration that interferes in several metabolic pathways, leading to cancer cell death. Among the main chemotherapy drugs, antimitotics directly affect cell division. This study aimed to investigate the effect of a pyrimidinone derivative (4-4-chloro-phenyl)-2-(-4-methoxy-phenyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-5-carbonitrile, Py-09) on embryonic development of the sea urchin *Echinometra lucunter*. Adult animals were collected at João Pessoa coast, Paraíba, Brazil and kept in filtered sea water under constant air flow. Gametes or embryos were treated with Py-09 and the effects of the compound were analyzed on fertilization, embryonic development, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), production of reactive oxygen species (ROS) and ABC transporters activity. Py-09 (12.5 μ M) inhibited around 60% fertilization of pretreated eggs. However, treatment of sperm with Py-09 did not affect fertilization rate. Treatment of zygotes with Py-09 inhibited the early embryonic development in a time and dose-dependent pattern, with the maximum effect at 50 μ M (EC₅₀ = 12.5 μ M). Morphological changes were observed in the pattern of embryos cleavage (unequal cleavage) and at larval stages (irregular distribution and cracks of spicules and pigment cells leakage). Py-09 induced the loss of $\Delta\Psi_m$ without altering ROS intracellular levels. The assays with ABCB1 and ABCC1 transporters inhibitors (Reversin 205 and MK571, respectively) showed that Py-09 is not ABC proteins substrate. The intracellular calcein accumulation assay and PY-09/vinblastine association demonstrated Py-09 was not able to increase intracellular calcein fluorescence levels and that the compound did not reverse MXR phenomenon. In summary, this study demonstrated that the Py-09 features a remarkable antimitotic activity, producing changes both in morphology and cell physiology. Further studies are needed for a better understanding of the mechanism of action of the compound, and research on the potential of Py-09 as pharmacological tool for in vitro studies, as well as its therapeutic use.

Keywords: antimitotic; pyrimidinone; fertilization; embryonic development; cell division.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura e nome químico do composto Py-09.....	35
Figura 2:	Protocolo experimental para investigação da atividade do Py-09 sobre o desenvolvimento embrionário.....	38
Figura 3:	Efeito do Py-09 na morfologia de embriões em estágios tardios do desenvolvimento embrionário.....	49
Figura 4:	Efeito do Py-09 no padrão de clivagem holoblástica no estágio 2 e 4 células.....	50
Figura 5:	Efeito do Py-09 sobre o $\Delta\Psi_m$ em embriões de 2 células.....	51
Figura 6:	Efeito do Py-09 sobre o $\Delta\Psi_m$ em embriões de 4 células.....	52
Figura 7:	Efeito do Py-09 sobre o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) de óvulos.....	55
Figura 8:	Efeito do Py-09 na produção de ROS 60 minutos após a fertilização.....	56
Figura 9:	Efeito do Py-09 na produção de ROS no tempo estágio 2 células.....	57
Figura 10:	Efeito do Py-09 na atividade de transportadores ABC em embriões de 2 células.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Efeito do tratamento dos espermatozoides com Py-09 sobre a fertilização.....	44
Gráfico 2:	Efeito do tratamento dos óvulos com Py-09 sobre a fertilização..	44
Gráfico 3:	Efeito do Py-09 sobre diferentes estágios do desenvolvimento embrionário.....	45
Gráfico 4:	Tratamento com Py-09 em diferentes tempos após a fertilização	47
Gráfico 5:	Efeito do Py-09 na produção de ROS no tempo de 60 minutos após a fertilização.....	56
Gráfico 6:	Efeito do Py-09 na produção de ROS no estágio 2 células.....	57
Gráfico 7:	Efeito da associação do Py-09 com o MK571 sobre o desenvolvimento embrionário.....	59
Gráfico 8:	Ensaio de associação com inibidores ABC.....	61
Gráfico 9:	Efeito do Py-09 na atividade de transportadores ABC em embriões de 2 células.....	63
Gráfico 10:	Ensaio de reversão do fenótipo MXR.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação entre o padrão de clivagem e o perfil de fluorescência do DiOC6 ₍₃₎ em embriões no estágio de 2 e 4 células.....	53
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	(do inglês, <i>ATP- binding cassette</i>)
ASW	Água do mar artificial (do inglês, <i>artificial sea water</i>)
C-AM	Calceína-AM
CCS	Dependentes do ciclo (do inglês, <i>cell cycle-specific</i>)
CCNS	Ciclo celular não-específico (do inglês, <i>cell cycle non-specific</i>)
DiOC₆(3)	Iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro Padrão da Média
FCCP	Carbonil cianeto de 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
FSW	Água do mar filtrada (do inglês, <i>filtered sea water</i>)
H₂DCFDA	Diacetato de 2'-7-dihidro dicloro fluoresceína
HPF	Horas após a fertilização
MAPS	Proteínas associadas ao microtúbulo (do inglês, <i>microtubule-associated proteins</i>)
MDR	Resistência à múltiplas drogas (do inglês, <i>multidrug resistance</i>)
MIF	Média de intensidade de fluorescência
MMI	Membrana mitocondrial interna
Pg-p	Glicoproteína P
Py-09	4-(4-Cloro-fenil)2-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidina-5-carbonitrila
REV	Reversina-205
ROS	Espécie reativa de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
TMRE	Tetrametilrodamina-etil-éster
UVA	Ultravioleta A

UVB Ultravioleta B

VB Vimblastina

VP Verapamil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. A quimioterapia e o tratamento contra o câncer.....	20
1.2. Os quimioterápicos e sua ação farmacológica.....	21
1.3. O fenômeno MDR como problemática para o tratamento do câncer.....	24
1.4. Os ouriços-do-mar como modelo experimental.....	26
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Material.....	34
3.1.1. Animais.....	34
3.1.2 Substâncias utilizadas.....	34
3.1.3 Equipamentos e programas computacionais utilizados.....	35
3.2 Métodos.....	36
3.2.1 Identificação do sexo, obtenção dos gametas e fertilização <i>in vitro</i>	36
3.2.2 Investigação do efeito do Py-09 sobre a fertilização.....	37
3.2.3 Investigação da atividade antimitótica do Py-09 em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário.....	37
3.2.4 Efeito tempo-dependente do Py-09.....	38
3.2.5 Efeito do Py-09 na morfologia dos embriões.....	39
3.2.6 Efeito do Py-09 no padrão de clivagem holoblástica dos embriões.....	39
3.2.7 Efeito do Py-09 sobre o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) em embriões e óvulos.....	39
3.2.8 Efeito do Py-09 sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em células embrionárias.....	40
3.2.9 Efeito da associação do Py-09 com inibidores de transportadores ABC no desenvolvimento embrionário.....	41
3.2.10 Ensaio do acúmulo intracelular de calceína.....	41
3.2.12 Análise estatística.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Efeito do Py-09 sobre o desenvolvimento embrionário.....	44
4.1.1 Efeito do Py-09 na fertilização.....	44

4.1.3 Efeito do Py-09 no desenvolvimento embrionário.....	45
4.1.3 Efeito tempo-dependente do Py-09.....	46
4.1.4 Efeito do Py-09 na morfologia dos embriões e larvas plúteo.....	48
4.1.5 Efeito do Py-09 no padrão de clivagem holoblástica dos embriões.....	50
4.2 Efeito do Py-09 sobre os parâmetros celulares.....	51
4.2.1 Efeito do Py-09 sobre o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) de células embrionárias.....	51
4.2.2 Efeito do Py-09 sobre o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) de óvulos.....	54
4.2.3 Efeito do Py-09 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células embrionárias.....	56
4.3 Efeito do Py-09 sobre a atividade de proteínas ABC e o fenótipo MXR...58	
4.3.1 Efeito da associação do Py-09 com o MK571 sobre o desenvolvimento embrionário.....	58
4.3.2 Efeito da associação do Py-09 com a REV205 sobre o desenvolvimento embrionário.....	60
4.3.3 Efeito do Py-09 na atividade de transportadores ABC.....	62
4.3.4 Efeito da associação do Py-09 e vimblastina no desenvolvimento embrionário.....	64
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS.....	88

Introdução

1. Introdução

O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células de um determinado tecido, que migram, invadem e comprometem funcionalmente, localmente ou à distância, células sãs do organismo. Considerada como a principal causa de morte em todo o mundo e devido à sua importância na morbidade e mortalidade, o câncer é objeto intenso de estudos científicos. Mesmo com uma conduta terapêutica incluindo diversos pontos de intervenção, medicamentos com ação citotóxica continuam a ser o suporte principal do tratamento do câncer (SHACHI, 2012). Atualmente, a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia, isoladamente ou conjugadas, fornecem alívio parcial ou transitório, e, em alguns casos, a cura definitiva.

Embora exista o registro de um dos mais antigos tumores no ser humano (um maxilar com sinais de linfoma, datado como 4.000 A.C.), não há um primeiro registro científico inaugural que fale sobre a doença, pois egípcios, persas e indianos, séculos antes de Cristo, já faziam menções aos tumores malignos. Mas foi a escola de medicina de Hipócrates na Grécia (pioneiros por separar a medicina da magia) que primeiramente definiu a doença como um tumor duro que, muitas vezes, reaparecia depois de extirpado. Desta época até o século XVI, os conhecimentos gerais de medicina consideravam que a doença era um desequilíbrio dos fluídos corpóreos e/ou um desequilíbrio do sistema linfático. Entretanto, somente em meados do século XX o câncer teve seu marco histórico com a descoberta do gás mostarda e da mostarda nitrogenada, ambos utilizados como armas químicas durante a Primeira e Segunda Guerra Mundial. Este gás provocou uma intensa mielodepressão em soldados expostos. Sendo assim, foi formulada a hipótese de que o gás mostarda poderia ser utilizado para o tratamento do câncer. A partir daí, a farmacologia se empenhou no tratamento de doenças neoplásicas, observando, a atividade de substâncias tanto contra quanto à favor do câncer (MURTHY *et al.*, 2011).

1.1. A quimioterapia e o tratamento contra o câncer

A quimioterapia é o principal tratamento do câncer, consistindo na administração de drogas que atuam por interferência direta no metabolismo celular, quer seja na síntese do DNA e RNA, na síntese protéica e em todas as fases do ciclo celular, com conseqüente comprometimento da via metabólica e morte celular (INCA, 2006).

Alguns agentes antineoplásicos necessitam da proliferação celular para exercer os seus efeitos citotóxicos, tendo ação preferencial em uma fase específica do ciclo celular, sendo chamados de agentes dependentes do ciclo (CCS, do inglês *Cell cycle-Specific*); outros apresentam efeitos citotóxicos em qualquer ponto do ciclo celular ou mesmo em células no estado de repouso, são os chamados agentes ciclo celular-não específicos (CCNS, do inglês *Cell cycle-Non Especific*) (ALMEIDA *et al.*, 2005; ROITHMANN, 1998).

A quimioterapia tem como um dos principais efeitos a indução de apoptose, a qual consiste em um processo de morte celular, que, no entanto, pode apresentar defeitos deletérios na sua via de sinalização em células tumorais, resultando na sobrevivência e proliferação destas populações celulares mesmo na presença de um agente quimioterápico (PFLAUM; SCHLOSSER; MÜLLER, 2014). Por outro lado, os quimioterápicos não atuam exclusivamente sobre as células tumorais. Os tecidos saudáveis que se renovam constantemente, como a medula óssea, os pêlos e a mucosa do tubo digestivo, são também atingidos pela ação desses compostos, o que pode provocar os mais diversos efeitos colaterais. Esses efeitos não são, obrigatoriamente, apresentados por todos os pacientes sob tratamento quimioterapêutico, uma vez que depende tanto do tipo das drogas utilizadas, quanto da forma com a qual o organismo responde ao tratamento. Assim, alguns pacientes podem apresentar efeitos colaterais mais severos, ou podendo até mesmo não apresentar qualquer sintoma (INCA, 2006). Com isso, as pesquisas na quimioterapia têm levado o foco para a descoberta de novos fármacos com efeitos secundários reduzidos, falta de resistência a múltiplas drogas, viabilidade sintética e de baixo custo (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2009; LAQUINTANA *et al.*, 2009).

1.2. Os quimioterápicos e sua ação farmacológica

Os quimioterápicos podem ser agrupados em várias categorias, de acordo com a sua interferência na via metabólica e sua constituição química, a saber: agentes alquilantes, antimetabólitos, hormônios, antibióticos antitumorais, inibidores da topoisomerase, compostos de platina e antimitóticos (CALABRESI, 2001).

Os agentes alquilantes atuam em todas as fases do ciclo celular, formando ligações cruzadas com os filamentos de DNA, impedindo a sua replicação e levando à morte tanto células em repouso quanto em processo de divisão. Seus principais representantes são a ciclofosfamida e a clorambucila (DIMOPOULOS *et al.*, 2007).

Os agentes antimetabólitos, representados pelo metotrexato, bloqueiam, bioquimicamente, a síntese do DNA e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular. Estes compostos agem inibindo a biossíntese das purinas, ácido timidílico e outras etapas da biossíntese de ácidos nucleicos (MURAD, 1996).

Os antibióticos antitumorais, representados pela doxorrubicina, possuem ação farmacológica se ligando fortemente a dupla hélice de DNA, através da intercalação entre as bases púricas e pirimídicas, interrompendo o prolongamento da cadeia de DNA e causando graves distorções cromossômicas. Estas distorções bloqueiam a síntese do novo RNA, DNA ou ambos, provocando a ruptura das fitas de DNA e impedindo a divisão celular. Estes compostos também geram radicais livres, os quais modificam a estrutura do DNA (CALABRESI, 2001).

Os inibidores da topoisomerase, representados pela camptotecina, agem ligando-se à topoisomerase I, formando um complexo estável através de ligações covalentes, impedindo a religação após a quebra da dupla fita de DNA (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 2006); por sua vez, os inibidores da topoisomerase II (merbarone), provocam quebras simples na molécula de DNA, retardando a fase S e o bloqueio do ciclo celular na fase G2. Além disso, esses inibidores bloqueiam a catenação e decatenação da topoisomerase II, induzindo a apoptose (LARSEN; ESCARGUEIL; SKLADANOWSKI, 2003; OTAKE; MIMS; FERNANDES, 2006; RANISE *et al.*, 2003).

Os compostos de platina, representados pela cisplatina, têm a sua atividade antitumoral atribuída à ligação ao DNA, quando os íons cloreto reagem com sítios nucleofílicos de DNA, RNA e proteínas, resultando em ligações que mudam a

conformação das macromoléculas, inibindo a transcrição e replicação (FUERTES *et al.*, 2003).

Drogas que alteram a síntese do DNA, como por exemplo, os análogos de purinas (azatioprina) e pirimidinas (5-fluoracil) agem antagonizando o metabolismo das bases nitrogenadas, afetando a síntese dos nucleotídeos, e, conseqüentemente, levando à danos no DNA e defeitos na síntese de proteínas, tendo caráter mutagênico ou carcinogênico. As drogas supracitadas podem agir, ainda, inibindo enzimas necessárias à formação de precursores da síntese de DNA. Além disso, a droga é incorporada diretamente em cadeias de DNA e RNA, perturbando suas funções. Como resultado, ocorre morte celular, especialmente de células que se proliferam mais rapidamente (STANDER *et al.*, 2012).

Os antimitóticos são outra importante classe de antineoplásicos, tendo como principais representantes os alcaloides da vinca e os taxanos. Os compostos antimitóticos são substâncias que impedem a divisão celular, interferindo, assim, na proliferação de células tumorais, levando-as à morte (MARZO; NAVAL, 2013). Muitos destes compostos afetam principalmente células de crescimento rápido, levando ao desenvolvimento de alguns efeitos tóxicos gerais, tais como: problemas neurológicos, hematológicos, dermatológicos, cardiovasculares, auditivos, gastrointestinais, respiratórios e hepáticos. Embora com origens e estruturas químicas distintas, os antimitóticos desempenham a sua ação farmacológica ao se ligarem à subunidade β da tubulina nas extremidades dos microtúbulos, reduzindo a sua capacidade de polimerização e despolimerização, e desencadeando, assim, um bloqueio de sua dinâmica de crescimento e encurtamento, conhecido como instabilidade dinâmica, que leva a célula à morte por apoptose ou necrose (NEPALI *et al.*, 2014). Os microtúbulos são estruturas tubulares rígidas compostas por um esqueleto de tubulina e MAPS (do inglês, *microtubule-associated proteins*) que determinam a forma celular e desempenham papéis importantes na divisão celular, tráfego de organelas, transporte, sinalização e migração celular (CASALUCE *et al.*, 2013). A instabilidade dinâmica, por sua vez, é um fenômeno altamente regulado, sendo um evento crítico na remodelação do citoesqueleto durante a mitose, um processo chave no ciclo celular. Um importante representante dessa classe de quimioterápicos é a vimblastina, um análogo da vincristina, alcaloide da vinca, que se liga a tubulina e inibe a montagem dos microtúbulos. É um fármaco bastante

utilizado na quimioterapia como inibidor da proliferação celular via bloqueio da mitose (MOUDI *et al.*, 2013; NAKAMURA; ISHIGAKI, 2014).

Uma classe de fármacos que tem despertado interesse farmacológico são os análogos de pirimidinas, que englobam uma diversidade interessante de drogas que têm em comum a capacidade de inibir a biossíntese de nucleotídeos pirimídicos ou simular esses metabólitos naturais interferindo, assim, nas funções celulares vitais, como por exemplo, a síntese dos ácidos nucleicos (CALABRESI, 2001). Estes compostos, incluindo também os seus derivados, têm recebido grande atenção devido às diversas atividades farmacológicas, tais como: antitumoral (MOHAMED *et al.*, 2013) , antiviral (AL-MOHIZEA *et al.*, 2012), antiparkinsoniana (AL-HARBI *et al.*, 2013) e antimicrobiana (HOSSAN *et al.*, 2012)

A dificuldade de isolar a maioria destes compostos, a partir de produtos naturais, faz da química sintética um dos melhores caminhos para obtê-los e, a partir de então, gerar novos derivados, tornando possível a síntese de diversos intermediários e produtos de interesse farmacêutico, químico e biológico (Joule; Milles; Smith, 2000; Theophil Eicher, Siegfried Hauptmann, 2013). Entre estes, podemos destacar as pirimidinonas, que estão entre os heterocíclicos mais importantes, sendo utilizados como blocos para a construção de moléculas alvo (Wannberg *et al.*, 2005), estando presentes em diversas moléculas biológicas, como as bases nitrogenadas, componentes essenciais do DNA e RNA, bem como em diversos produtos com atividade biológica.

1.3. O fenômeno MDR como problemática para o tratamento do câncer

O sucesso da quimioterapia depende da parcimônia no uso clínico e a eficácia do medicamento. Além da grande incidência de efeitos colaterais que causam sofrimento ao paciente, muitos desses compostos possuem sua ação limitada pelo fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR, do inglês *multidrug resistance*) e pelo baixo índice terapêutico. Este último é um problema multicomponente, relacionado com a potência no alvo ou fora dele, e farmacodinâmica, além de outros fatores (Kiselyov *et al.*, 2010). O fenômeno MDR é motivo do insucesso de diversas terapias antitumorais, devido ao aumento do efluxo de agentes quimioterápicos, o que leva à diminuição dos níveis intracelulares de drogas e consequente falência terapêutica (Fletcher; Haber, 2010). Este

fenômeno pode ser mediado por: (i) mudanças nos níveis de expressão de proteínas alvos dos agentes quimioterápicos; (ii) mutações que diminuem a atividade do quimioterápico; (iii) modificações do metabolismo e alteração da via de sinalização da apoptose; (iv) aumento na tolerância celular aos danos causados pelos quimioterápicos; e, principalmente, (v) diminuição no acúmulo intracelular do quimioterápico (HALL; HANDLEY; GOTTESMAN, 2009).

Os tumores podem ser resistentes aos quimioterápicos devido à atividade de efluxo mediada por proteínas da superfamília ABC (do inglês *ATP binding cassette*), que diminuem a concentração efetiva da droga e impedem a sua ação farmacológica. As proteínas ABC têm sido identificadas em uma grande variedade de organismos e realizam o transporte de vários compostos, dentre eles: hormônios, lipídios, peptídeos, metais pesados, xenobióticos e até mesmo íons (LOO; CLARKE, 2008). Algumas drogas têm sido identificadas como bloqueadores ABC, induzindo o aumento da concentração intracelular de substrato. Essas drogas incluem substâncias díspares, que não são nem farmacologicamente nem quimicamente relacionadas (ROBERT; JARRY, 2003) tais como: verapamil (bloqueadores de canais de cálcio), quinina (anti-maláricos), cefalosporinas (antibióticos), clorpromazina (antagonistas da calmodulina), ciclosporina A (agentes imunossupressores), progesterona e tamoxifeno (hormônios esteróides e não-esteróides, respectivamente), pepstatina A (peptídeos cíclicos) e muitos outros compostos lipofílicos (KRISHNA; MAYER, 2000; LISCOVITCH, 2002; STAVROVSKAYA, 2000). Outros inibidores de transportadores ABC, muito utilizados em estudos *in vitro*, são: a reversina²⁰⁵ (REV205), que bloqueia o transportador ABCB1 (também conhecido como glicoproteína-p; Pg-p) e o MK571, o qual bloqueia a proteína ABCC1. Tais compostos têm sido utilizados como ferramentas de investigação farmacológica de atividade de transportadores ABC em uma vasta gama de modelos biológicos (ROBERT; JARRY, 2003). Os bloqueadores de transportadores ABC podem ser usados, também, para influenciar na biodisponibilidade oral de fármacos e na distribuição de drogas no sistema nervoso central (SZAKÁCS *et al.*, 2006).

Os bloqueadores mencionados atuam, principalmente, sobre o transportador ABCB1, uma fosfoglicoproteína, que é produto do gene humano *mdr1* e desempenha uma função relevante no mecanismo de resistência à xenobióticos. A

proteína ABCB1 apresenta duas metades homólogas cada uma com um sítio de ligação para o ATP, onde ocorre a sua hidrólise, e seis domínios transmembranares. Existem vários mecanismos (GOTTESMAN; BATES; SUSAN, 2002) propostos para o efluxo de xenobióticos, e um dos mais conhecidos é o do *aspirador hidrofóbico*, onde a Pg-p forma um canal através do qual o substrato pode ser expelido do citosol, sob forma carregada, ou diretamente da membrana plasmática, sob a forma neutra (LITMAN *et al.*, 2001; RAVIV *et al.*, 1990). Uma adaptação deste modelo foi proposta por Stein (1997), que considera a ocorrência de mudanças na conformação da proteína através da hidrólise de ATP. Estas mudanças conformacionais levariam à abertura de um “canal” pelo qual o quimioterápico seria expelido. Um terceiro mecanismo proposto, o modelo da *flipase*, o substrato penetra na camada fosfolipídica interior da membrana e só depois interage com a proteína, que transfere o composto da camada fosfolipídica interior da membrana celular para a camada fosfolipídica exterior, difundindo-se, em seguida, para o meio extracelular (HIGGINS; GOTTESMAN, 1992). Outra hipótese é que a proteína ABCB1 module a concentração intracelular de substâncias de forma indireta, regulando o gradiente de pH e o potencial elétrico da membrana plasmática (AGUILA *et al.*, 1998). Sendo assim, os compostos com a capacidade de reverter o fenótipo MDR são importantes na terapêutica do câncer. Porém, tais substâncias podem interferir em outros processos celulares, conferindo um grande número de efeitos colaterais que limitam seriamente o seu uso clínico. Alguns destes bloqueadores são substratos das próprias bombas de efluxo, e altas concentrações destes compostos podem ser requeridas para aumentar o acúmulo de drogas citotóxicas em células que superexpressam os transportadores ABC. Além disto, a potência dos inibidores depende, normalmente, da droga citotóxica para a qual a resistência está sendo sensibilizada: por exemplo, o verapamil é um potente inibidor da resistência de paclitaxel e vimblastina, mas não de outros quimioterápicos (BORGNI; EYTAN; ASSARAF, 1996; LAVIE *et al.*, 1997; SCALA *et al.*, 1997). As células tumorais, por sua vez, podem ser intrinsecamente resistentes ou adquirir MDR após exposição a drogas citotóxicas. Portanto, modelos *in vitro* são importantes para a investigação de mudanças fenotípicas provocadas por agentes citotóxicos e o possível desdobramento em testes pré-clínicos de novas drogas contra o câncer (PODOLSKI-RENIĆ *et al.*, 2013).

1.4. Os ouriços-do-mar como modelo experimental

Os ouriços-do-mar representam um organismo-modelo que vêm sendo utilizado há bastante tempo, principalmente no campo da Biologia do Desenvolvimento e da Biologia Celular. Grande parte do conhecimento atual sobre a fertilização e a formação de organismos multicelulares foi adquirida a partir de estudos desenvolvidos com esses animais. O envolvimento do centríolo na fertilização e na divisão celular (SCHATTEN, H *et al.*, 1986), a descoberta do aparato mitótico (GROSS; PHILPOTT; NASS, 1958) e o papel biológico das ciclinas são exemplos de conhecimentos originados em estudos utilizando ouriços-do-mar como modelo experimental (ERNST, 1997; EVANS *et al.*, 1983; MONROY, 1986). Recentemente, foi elucidado o genoma do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus*, sendo possível demonstrar que os ouriços-do-mar estão mais proximamente relacionados com os vertebrados do que outros principais organismos invertebrados utilizados como modelo no estudo do desenvolvimento, como a *Drosophila melanogaster* e o *Caenorhabditis elegans* (SODERGREN *et al.*, 2006).

Os ouriços-do-mar pertencentes ao filo Echinodermata, o segundo maior grupo de deuterostômios, o qual reúne cerca de 7.000 espécies viventes. São equinóides regulares, pois seu corpo tem formato arredondado. São animais marinhos e bentônicos, apresentando uma carapaça composta de ossículos fundidos, a qual é recoberta por espinhos, e apresentam simetria radial pentâmera nos indivíduos adultos (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Os deuterostômios são caracterizados por apresentarem diversos aspectos embrionários peculiares: clivagem holoblástica radial, onde as primeiras divisões são paralelas ou perpendiculares ao eixo polar; as células originadas das primeiras clivagens são pluripotentes, onde cada qual pode se desenvolver em uma larva completa (GILBERT, 2000). O zigoto passa a sofrer diversas divisões celulares mitóticas (clivagens) de forma rápida e sincronizada, a fim de ser convertido em um embrião multicelular. Em ouriços-do-mar, a clivagem é dita holoblástica (o sulco de clivagem percorre todo o zigoto, levando-o a uma segmentação total), radial (os planos de clivagem são paralelos ou em ângulos retos) e igual (os blastômeros apresentam o mesmo tamanho até a terceira clivagem). A partir da quarta clivagem, o embrião

apresenta 16 blastômeros, que podem ser utilizados como ponto de partida para a análise de linhagens celulares e simetria bilateral (SUMMERS *et al.*, 1993).

Em ouriços-do-mar *Echinometra lucunter*, a primeira clivagem, que representa o embrião com duas células, ocorre noventa minutos após a fertilização. Nesse estágio, as células apresentam o mesmo tamanho e o embrião se encontra envolto pelo envelope de fertilização, o qual auxilia na adesão dos blastômeros e na manutenção da unidade do embrião. A segunda clivagem pode ser visualizada duas horas após a fusão dos gametas, conferindo quatro células ao embrião. O estágio de mórula, proveniente da quarta e quinta clivagem, é caracterizado por possuir pelo menos 16 células; tais células possuem tamanhos diferenciados e são denominadas mesômeros, macrômeros e micrômeros. Os mesômeros estão localizados no pólo animal do embrião, ao passo que os macrômeros e micrômeros estão presentes na porção vegetal do embrião (SUMMERS *et al.*, 1993). As clivagens subsequentes continuam produzindo células cada vez menores, sendo que não há nenhuma designação específica para embriões em estágios que ultrapassam 64 células. O estágio de blástula, que ocorre em torno de 6-8 horas após a fertilização e apresenta em torno de 128 a 1000 células (blástula inicial e eclodida, respectivamente), consiste na presença de uma cavidade preenchida por fluídos proteicos, denominada blastocele. Na blástula tardia, o embrião começa a perder o envelope de fertilização e a adesão dos blastômeros é assegurada por junções intercelulares (DAN-SOHKAWA; FUJISAWA, 1980). Este estágio é caracterizado pelo aparecimento dos pólos vegetal e animal, e os blastômeros, derivados de diferentes regiões do zigoto, passam a ter diferentes tamanhos e propriedades (GILBERT, 2000). O estágio subsequente é denominado gástrula, caracterizada principalmente pelo aparecimento do arquêntero, o intestino primitivo do animal. A seguir, há uma mudança significativa no formato do embrião, onde ocorre a diferenciação das estruturas larvais, caracterizando o estágio de prisma. Neste estágio há o surgimento das células pigmentares, as quais são responsáveis pela fotoproteção, fototropismo e coloração do corpo do animal, e a presença de espículas que são estruturas que constituem os rudimentos do esqueleto larval. Por fim, o estágio conhecido como larva plúteo é caracterizado pelo aparecimento dos braços pré e pós-orais e a trirradiação das espículas, dando origem às hastes do esqueleto do animal.

Os ouriços-do-mar vêm sendo utilizados como modelo experimental em estudos científicos de diversas áreas devido à várias características peculiares. Os animais adultos têm ampla distribuição geográfica, são fáceis de coletar e a sua manutenção em laboratório é relativamente simples. Em relação à sua reprodução, são animais dióicos, com fertilização externa, e a obtenção dos gametas é realizada de forma não invasiva. O desenvolvimento é indireto, com uma fase larval de simetria bilateral. São obtidos milhões de gametas maduros a partir de um único indivíduo e seus óvulos e embriões são relativamente grandes (75 – 200 μm), o que permite um fácil acompanhamento dos estágios de desenvolvimento sob microscopia óptica comum. Os embriões são cultivados em água do mar, não necessitando de condições estéreis (MONTENEGRO *et al.*, 2004; SEMENOVA, M. N.; KISELYOV; SEMENOV, 2006). A fertilização *in vitro* ocorre com alta eficiência e o desenvolvimento embrionário envolve divisões celulares rápidas e sincrônicas, o que permite a identificação do atraso ou da interrupção na progressão de qualquer fase do ciclo celular. O ciclo celular do óvulo é interrompido somente após o término da meiose e apresenta várias similaridades com o ciclo celular de células humanas, fazendo desses animais um ótimo modelo para prospecção de compostos com atividade antimitótica (ERNST, 1997; MILITÃO *et al.*, 2007; MONTENEGRO *et al.*, 2004; WHITAKER, 1997).

A utilização do desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar, como modelo experimental possibilita a descoberta de compostos que interferem no processo de divisão celular, e que, de forma independente, apresentando ou não relevância clínica, possam ser utilizados como ferramentas farmacológicas na área da Biologia Celular, permitindo o estudo de diversos processos celulares, tais como: a prospecção de compostos inibidores de síntese de DNA e RNA, inibidores de síntese protéica e inibidores de reorganização de microtúbulos. Um grande número de fármacos com atividade antineoplásica foi inicialmente estudado em ouriços-do-mar, entre eles a 5-fluorouracil (LALLIER, 1965), a dactinomicina (KIEFER; ENTELIS; INFANTE, 1969), o taxol (SCHATTEN *et al.*, 1982), a vincristina (STARLING; BURNS, 1975), e a cicloheximida (BLACK; BAPTIST; PILAND, 1967). Adicionalmente, embriões de ouriços-do-mar também vêm sendo utilizados como modelo para avaliação neurotoxicológica de diversos compostos no desenvolvimento de mamíferos (QIAO *et al.*, 2003). Além disso, esse modelo

permite, também, a investigação de compostos com atividade espermicida, de bloqueadores de canais de sódio e de agentes mobilizadores de cálcio reticular, uma vez que o controle de fluxo desses íons desempenha um papel crucial na fertilização e no desenvolvimento embrionário (DE ARAÚJO LEITE; MARQUES-SANTOS, 2012; MONTENEGRO *et al.*, 2004).

Os embriões e gametas de ouriço-do-mar expressam proteínas ABC, particularmente os transportadores ABCB1 e ABCC1, sendo a sua atividade funcional máxima atingida 25 minutos após a fertilização (DE SOUZA *et al.*, 2010; HAMDOUN *et al.*, 2004). Hamdoun e colaboradores (2004) sugerem que as alterações na constituição proteica da membrana do zigoto, mediadas pela exocitose/endocitose, seja responsável pela superexpressão de transportadores ABC na membrana da célula embrionária após a fertilização. Estudos realizados pelo nosso grupo caracterizaram a atividade de proteínas ABCB1 e ABCC1 em gametas e células embrionárias de ouriços-do-mar *E. lucunter* (DE SOUZA *et al.*, 2010) e o seu envolvimento na fertilização (SILVA-NETA *et al.*, 2012), demonstrando que a atividade funcional destes transportadores parece ser um fenômeno geral no desenvolvimento embrionário de ouriço-do-mar. Além disto, estas proteínas se apresentam como primeira linha de defesa celular contra estresses químicos e físicos, como mostra o estudo de Araújo Leite e colaboradores (2014), que reportou, pela primeira vez, o papel protetor de transportadores ABC contra os efeitos nocivos promovidos pelas radiações UVA e UVB em gametas e células embrionárias de ouriço-do-mar. Tais achados certificam estes organismos como modelo experimental para estudos sobre a atividade de transportadores ABC assim como para a prospecção de novos compostos que interfiram com a atividade destas proteínas.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito de um novo composto sintético, o Py-09, um derivado da pirimidinona, sobre parâmetros celulares e desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar, utilizando técnicas e ferramentas de biologia celular.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito do Py-09 - um composto derivado de pirimidinona - no desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter*.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram investigar:

- O efeito do Py-09 sobre a fertilização;
- A atividade antimitótica do Py-09 em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário;
- O efeito do Py-09 sobre o potencial da membrana mitocondrial interna (MMI) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células embrionárias de ouriços-do-mar;
- O efeito do Py-09 sobre a atividade de proteínas ABC e o fenótipo MXR

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1. Animais

Ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) adultos foram coletados no Oceano Atlântico – costa litorânea de João Pessoa – Paraíba, Brasil (7°9'20"L, 34°47'35"O). As coletas foram realizadas em maré-baixa (0,0 e 0,5 m). Os animais foram retirados de seu habitat e transportados ao laboratório em recipientes plásticos contendo água do mar do local. A captura desses animais foi previamente autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio – Autorização 32105-2).

No laboratório, os animais foram lavados com água do mar filtrada em malha de filtragem com porosidade de 50 µm (FSW, do inglês *Filtered Sea Water*), para a retirada de fezes, microorganismos e parasitas aderidos à sua superfície e em seguida foram acondicionados em aquário contendo 4 litros de FSW por animal. Os animais foram mantidos sob constante aeração, utilizando filtro biológico do tipo *sump*. A salinidade era mantida em $35 \pm 2\%$, pH 8,0 e temperatura em torno de 25°C.

3.1.2 Reagentes utilizados

O 4-(4-Cloro-fenil)-2-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-1,6-diidro-pirimidina-5-carbonitrila (Py-09), um produto sintético derivado de Pirimidinona (Fig. 1), foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, do Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular – LSVM, Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba. O Py-09 foi dissolvido em DMSO (50%) e tween 80 (0,005%) em proporções não-tóxicas, resultando em uma solução estoque de 10mM, mantido sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) e estocado por até 45 dias após sua preparação.

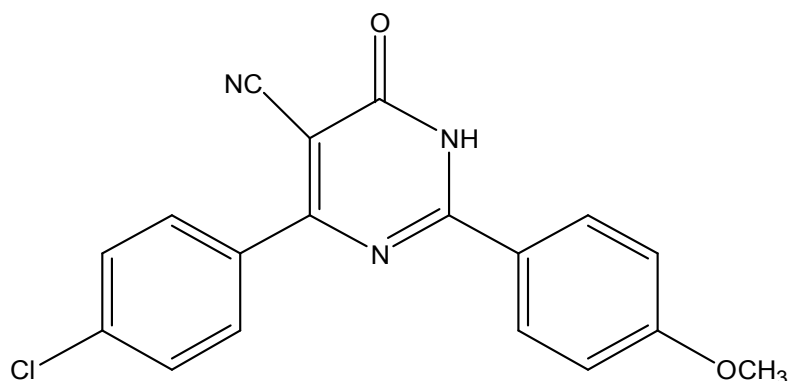


Figura 1: 4-(4-Cloro-fenil)-2-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-1,6-diidro-pirimidina-5-carbonitrila (Py-09)

As outras substâncias utilizadas foram: calceína-AM (C-AM); carbonil cianeto de 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP); cloreto de potássio (KCl); 3,3' iodeto diexiloxacarbocianina [DiOC₆(3)]; diacetato de 2',7'-dihidro-diclorofluoresceína (H2DCFDA); MK571; peróxido de hidrogênio (H₂O₂); tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE); Verapamil (VP) e Reversina (REV). Todas as substâncias foram obtidas da Sigma-Aldrich Corporation, Oregon, EUA.

3.1.3 Equipamentos e programas computacionais utilizados

Os equipamentos utilizados consistiram em microscópio Olympus BX41 equipado com lâmpada de halogênio e sistema de captura de imagens Olympus Q-Color5TM. Os programas computacionais utilizados nas análises das imagens foram o Image J (National Institutes of Health), Bethesda, MD, U.S.A.) e o QImaging Q Capture versão 6.0.

3.2 Métodos

3.2.1 Identificação do sexo, obtenção dos gametas e fertilização *in vitro*

A identificação do sexo dos ouriços-do-mar e a obtenção dos gametas foram realizadas segundo Monroy e colaboradores (1961). A determinação do sexo foi realizada por meio de estimulação elétrica com auxílio de um eletro-choque de 12 V, com corrente alternada. Um eletrodo foi disposto na região aboral do animal e o outro na região oral. De acordo com a coloração da secreção liberada, os animais foram classificados em macho (branco) ou fêmea (alaranjada).

Os gametas masculinos e femininos foram obtidos mediante a injeção intracelômica de 3 mL de cloreto de potássio (KCl 0,5 M). A obtenção dos gametas foi limitada a até 15 minutos após o estímulo, no intuito de evitar a captura de células imaturas. Após a inoculação do KCl, a fêmea foi colocada em um béquer contendo FSW, com a superfície aboral voltada para baixo, de forma que os gonóporos fiquem imersos na água. Os óvulos de cada fêmea foram observados sob microscopia óptica comum para verificação de aspectos morfológicos, tais como circunferência celular, tamanho e homogeneidade da amostra. O esperma, por sua vez, foi coletado na ausência de FSW, com o auxílio de uma micropipeta (200 μ L) e armazenado em microtubos e refrigerados à 4 °C até o momento dos ensaios, por um período máximo de 10 dias. A diluição espermática foi realizada na proporção de 1:50.000, sendo feita imediatamente antes dos procedimentos experimentais, no intuito de ativar os gametas.

Após a coleta dos óvulos, os mesmos foram transferidos para uma proveta de 500 mL a fim de realizar dois procedimentos de decantação. Esse processo é essencial para a remoção da camada gelatinosa presente nos óvulos e resulta em uma maior taxa de fertilização. Após a última decantação, os óvulos foram ressuspensos em 50 mL de ASW e, após a determinação da concentração celular com o auxílio de uma câmara de Neubauer, foi ajustada para 1×10^4 óvulos/mL.

A fertilização foi realizada através da adição de uma suspensão de espermatozoides em uma suspensão de óvulos numa proporção de 1:100, sob leve agitação em temperatura ambiente. Os zigotos foram transferidos para uma placa de cultura de 24 poços (2 mL/poço, em triplicata). A placa, então, foi mantida em

incubadora à 28°C até o final dos ensaios. A fertilização foi, então, confirmada por microscopia óptica comum, a partir da observação da elevação do envelope de fertilização, 10 minutos após o contato inicial dos gametas.

3.2.2 Investigação do efeito do Py-09 sobre a fertilização

Foram realizados ensaios de bloqueio de fertilização onde os gametas foram tratados, separadamente, com o Py-09 antes da realização do procedimento de fertilização *in vitro*. A suspensão de óvulos, após o ajuste da concentração e distribuição nos poços da placa de cultura, foi tratada com o Py-09 (12,5 µM). Dez minutos após, foi realizada a fertilização e os embriões foram observados sob microscopia óptica no estágio de 2 células, correspondente a 90 minutos após a fertilização. Já os espermatozoides, após serem ressuspensos em FSW, foram devidamente tratados com o Py-09 e, dez minutos depois, foi realizada a fertilização. Os embriões foram observados sob microscopia óptica comum, também no estágio 2 células. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes de maneira independente. A confirmação da fertilização foi monitorada sob microscopia óptica comum, com a observação da progressão do desenvolvimento para a primeira clivagem.

3.2.3 Investigação da atividade antimitótica do Py-09 em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário

Uma vez realizada e confirmada a fertilização (mínimo de 90% de óvulos fertilizados), as células foram tratadas com o composto em estudo, sob diferentes concentrações (3,12 µM à 50 µM). O desenvolvimento embrionário foi monitorado sob microscopia óptica comum em espaços de tempos determinados para os estágios de primeira clivagem, segunda clivagem e mórula.



Figura 2: Protocolo experimental para investigação da atividade do Py-09 sobre o desenvolvimento embrionário. Os embriões foram tratados com diferentes concentrações do Py-09, 10 minutos após a fertilização e, em seguida, analisados em diversos estágios do desenvolvimento sob microscopia óptica comum.

Os veículos utilizados na preparação da solução estoque de Py-09 não afetaram o desenvolvimento embrionário em nenhuma das concentrações utilizadas (0,5% DMSO e 0,05% tween 80, concentração final - dados não mostrados).

3.2.4 Efeito tempo-dependente do Py-09

Uma vez confirmada a fertilização, os embriões foram tratados, em diferentes intervalos de tempo (0,5 min a 80 min), com o Py-09 12,5 μ M (corresponde a concentração que inibe em torno de 50% do desenvolvimento embrionário) e o desenvolvimento embrionário monitorado sob microscopia óptica comum em espaços de tempos determinados para os estágios de primeira clivagem, segunda clivagem e mórula.

3.2.5 Efeito do Py-09 na morfologia dos embriões

Após a confirmação da fertilização, os embriões foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços contendo FSW, mantidos em germinador a 28°C e protegidos da luz, e tratados com o Py-09 em diferentes tempos: 12, 18 e 24 horas após a fertilização (hpf), para observação de estágios de desenvolvimento embrionário tardio. Para observação da morfologia da gástrula, os embriões foram coletados 18 hpf. As imagens foram obtidas com lente objetiva de aumento de 40x e adquiridas com sistema de captura de imagens. Para observação de alterações morfológicas nos estágios de prisma e larva (24 e 48 hpf, respectivamente), os embriões foram transferidos previamente para erlenmeyers de 200mL, contendo 100mL da solução de embriões e 100mL de FSW. As imagens foram obtidas com lente objetiva de aumento de 40x e adquiridas com sistema de captura de imagens.

3.2.6 Efeito do Py-09 no padrão de clivagem holoblástica dos embriões

Os embriões foram tratados com o Py-09 (12,5 μ M) dez minutos após a fertilização. Ao atingirem o estágio 2 células, correspondente a 90 minutos após a fertilização, foram obtidas fotomicrografias, sob microscopia de contraste de fase, para análise do padrão de clivagem dos embriões. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes de maneira independente. As análises das amostras foram feitas utilizando em torno de 50 embriões por amostra.

3.2.7 Efeito do Py-09 sobre o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) em embriões e óvulos

Os embriões foram preparados como descrito no item 3.2.1, tratados com o Py-09, 10 minutos após a fertilização, e incubados em placas de cultura de 24 poços, sob temperatura ambiente e protegidos da luz, com a sonda mitocondrial sensível ao $\Delta\Psi_m$: DiOC₆(3) (250 nM) – 30 minutos de incubação. O padrão de distribuição do DiOC₆(3) foi avaliado sob microscopia de fluorescência – excitação

488 nm. As imagens foram obtidas com lente objetiva de aumento de 40x e adquiridas com sistema de captura de imagens.

Foi realizada uma contagem diferencial de embriões, considerando desenvolvimento normal, anormal e células não desenvolvidas, com ou sem padrão pontuado (*"snake-like"*). Tal análise foi feita em um total de 100 embriões por tratamento.

Para analisar o efeito do Py-09 sobre o $\Delta\Psi_m$ de óvulos, os mesmos foram preparados como descrito no item 3.2.1, transferidos para placas de 24 poços e tratados com o Py-09 (12,5 μM). Os gametas femininos foram incubados em temperatura ambiente e protegidos da luz, com a sonda mitocondrial sensível ao $\Delta\Psi_m$: TMRE (250 nM), por 10 minutos. O padrão de distribuição do TMRE foi avaliado sob microscopia de fluorescência – excitação 545 nm. As imagens foram obtidas com lente objetiva de aumento de 40x e adquiridas com sistema de captura de imagens. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes de maneira independente.

3.2.8 Efeito do Py-09 sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em células embrionárias

Dez minutos após a fertilização, os zigotos foram tratados com o Py-09 e incubados, sob temperatura ambiente, em placas de cultura de 24 poços e na ausência de luz, com a sonda H_2DCFDA (10 μM) 30 minutos antes da análise (60 e 90 minutos após a fertilização). O peróxido de hidrogênio (1 mM) foi utilizado como controle positivo. A produção de ROS em embriões foi analisada sob microscopia de fluorescência – excitação 488 nm. As imagens foram obtidas com lente objetiva de aumento de 40x e adquiridas com sistema de captura de imagens. A média da intensidade de fluorescência (MIF) foi calculada com o auxílio do programa Image J. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes de maneira independente.

3.2.9 Efeito da associação do Py-09 com inibidores de transportadores ABC no desenvolvimento embrionário

Para verificar se o composto em estudo é substrato de proteínas ABC, foram feitas associações com inibidores clássicos destes transportadores: Reversina (10 μ M, inibidor do transportador ABCB1) e MK571 (10 μ M, inibidor do transportador ABCC1). Após a realização e confirmação da fertilização *in vitro*, um grupo dos embriões foram tratados com o Py-09, e os demais, tratados com o Py-09 em associação com cada inibidor. Para tanto, utilizou-se, além da CE₅₀ do composto em estudo, mais duas concentrações: uma que inibe cerca de 20% do desenvolvimento embrionário (3,12 μ M) e outra que inibe em torno de 80% (25 μ M). Os embriões foram devidamente observados em microscopia óptica comum nos estágios de 2 células, 4 células e mórula, realizando a contagem diferencial de células desenvolvidas e não desenvolvidas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes de maneira independente.

3.2.10 Ensaio do acúmulo intracelular de calceína

Este ensaio foi utilizado para investigar o efeito do Py-09 sobre a atividade dos transportadores ABCB1 e ABCC1, conforme descrito por Hamdoun e colaboradores (2004). Para investigar se o Py-09 atua como inibidor de transportadores ABCB1, os embriões foram tratados com verapamil (VP, 10 μ M), um inibidor clássico de proteínas ABCB1, ou o Py-09, 10 minutos após a fertilização. Posteriormente, as células foram incubadas com a calceína-AM (100nM), sob temperatura ambiente e na ausência de luz. O acúmulo intracelular de calceína foi analisado em microscopia de fluorescência- excitação 488nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes de maneira independente.

3.2.11 Avaliação da reversão do fenótipo MXR

Para a realização deste ensaio, utilizou-se um antimitótico conhecido, a vimblastina (VB), a qual também é substrato de transportadores ABC. Foram utilizadas duas concentrações desta droga: 100 nM, que inibe apenas 20% do desenvolvimento, e 400 nM que inibe o desenvolvimento embrionário em torno de 80%. Assim, 10 minutos após a fertilização, os embriões foram tratados com o Py-09 e/ou com a vimblastina. Os embriões foram devidamente observados em microscopia óptica comum nos estágios de 2 células, 4 células e mórula, realizando a contagem diferencial de células desenvolvidas e não desenvolvidas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes de maneira independente.

3.2.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa GraphPadPrism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), através de análise de variância One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey's e foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$ ou $p \leq 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do Py-09 sobre o desenvolvimento embrionário

4.1.1 Efeito do Py-09 na fertilização

Os espermatozoides e óvulos foram tratados com o Py-09 (12,5 μ M), 10 minutos antes da fertilização, e a progressão para o estágio de 2 células foi monitorada sob microscopia óptica. O monitoramento da progressão para o estágio de primeira clivagem foi utilizado para confirmar a fertilização. O tratamento dos espermatozoides com o composto não afetou a fertilização (Gráfico 1). No entanto, o tratamento dos óvulos inibiu a fertilização em cerca de 60% (Gráfico 2).

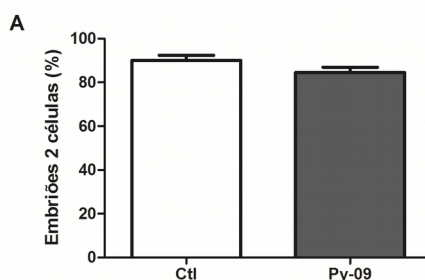


Gráfico 1. Efeito do tratamento dos espermatozoides com Py-09 sobre a fertilização. Dados representativos de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Ctl: grupo controle; Py-09: 12,5 μ M.

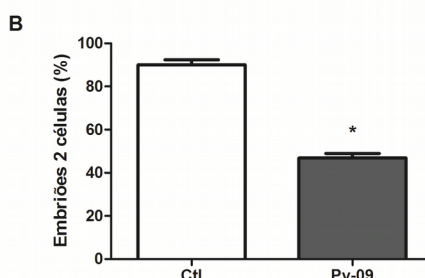


Gráfico 2. Efeito do tratamento dos óvulos com Py-09 sobre a fertilização. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. * $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey). Ctl: grupo controle; Py-09: 12,5 μ M.

4.1.3 Efeito do Py-09 no desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário foi inibido de maneira concentração dependente (Gráfico 3), tanto nos estágios de primeira clivagem (90 min), segunda clivagem (120 min) e mórula (240 min). Os valores obtidos da EC_{50} para cada estágio foram respectivamente: 12,5 μ M; 6,5 μ M e 12,2 μ M.

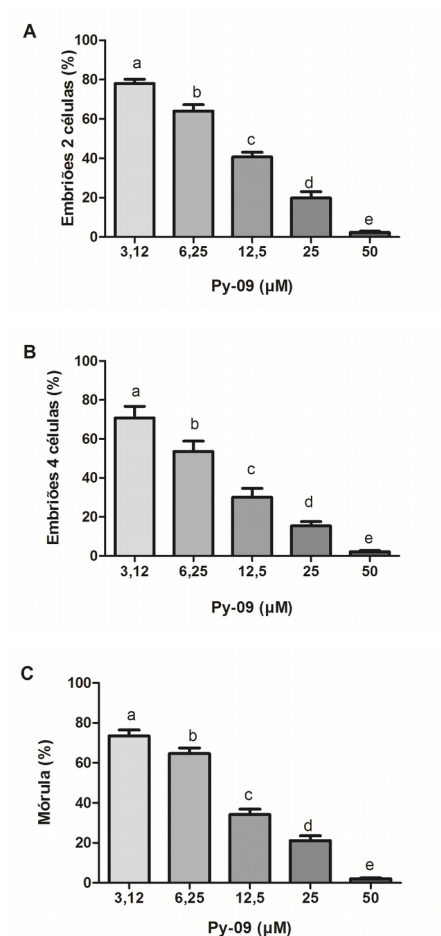
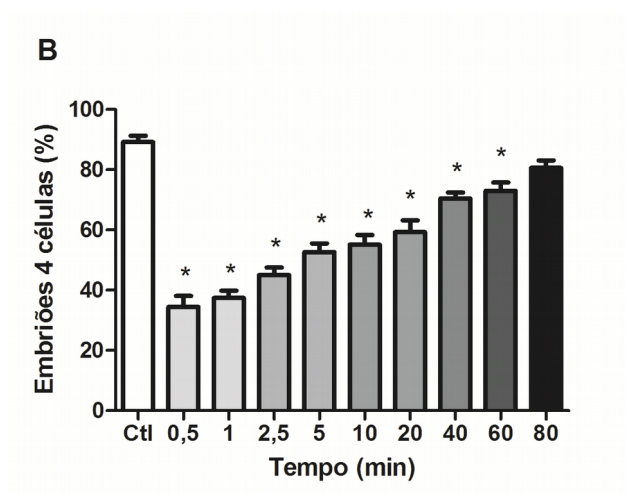
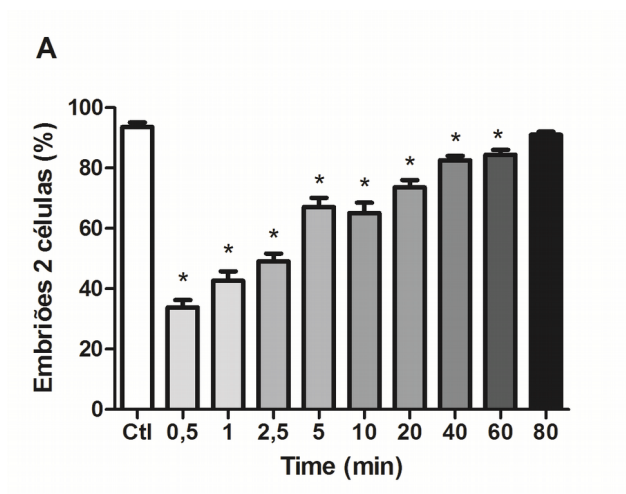


Gráfico 3. Efeito do Py-09 sobre diferentes estágios do desenvolvimento embrionário. A – Estágio de primeira clivagem; B – Estágio de segunda clivagem; C – Estágio de Mórula. Os dados representam a média $\pm$ EPM de pelo menos 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Grupos de tratamento com letras iguais não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste One-way ANOVA seguido pelo pós- teste de Tukey ($p < 0.001$).

4.1.3 Efeito tempo-dependente do Py-09

Com o objetivo de avaliar o efeito tempo-dependente, do composto em estudo, sobre o desenvolvimento embrionário, os embriões foram tratados com o Py-09 (12,5 μ M) em diferentes intervalos de tempo após a fertilização (Gráfico 4). Quando o composto foi adicionado 30 segundos após a fertilização, a progressão para o estágio de 2 células foi de apenas $33,89 \pm 2,37\%$, apresentando o momento de maior efeito inibitório exercido pelo composto. Enquanto que no tempo de 60 minutos após a fertilização, a progressão para a segunda clivagem foi de $84,44 \pm 1,58\%$. A adição do Py-09, 80 minutos após a fertilização, não apresentou efeito inibitório sobre o desenvolvimento nos três estágios monitorados (Gráfico 4).



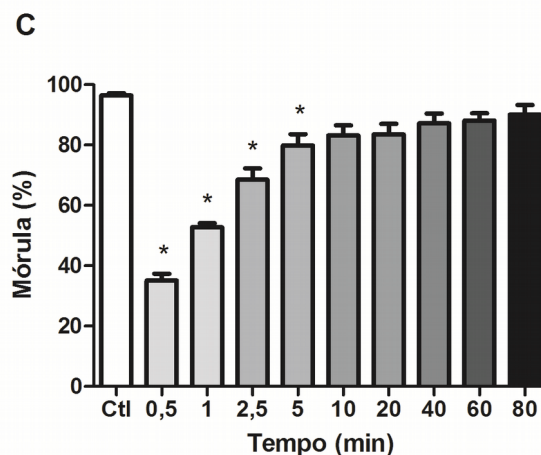


Gráfico 4. Tratamento com Py-09 em diferentes tempos após a fertilização. A – Estágio de primeira clivagem; **B –** Estágio de segunda clivagem; **C –** Estágio de mórula. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. * $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

4.1.4 Efeito do Py-09 na morfologia dos embriões e larvas plúteo

Foram analisadas as alterações morfológicas após tratamento com Py-09 (12,5 μ M) nos estágios de gástrula, prisma e larva plúteo. No estágio de gástrula, mais precisamente em gástrula tardia (Figura 3A), foi observada a ausência da formação do tubo intestinal primitivo, conhecido como arquêntero, no grupo tratado (Fig.3B).

O tratamento com Py-09 afetou o desenvolvimento para o estágio de prisma. Foi observada uma distribuição irregular das espículas em comparação com o grupo controle (Fig. 3D em comparação com a Fig. 3C), acarretando, assim, na má formação do esqueleto. No entanto, foi notada tanto a presença quanto uma distribuição regular das células pigmentares no grupo tratado com o Py-09.

As larvas plúteos apresentaram diversas alterações morfológicas, desde fissuras nas espículas até o extravasamento de células pigmentares, caracterizando uma perda da integridade das larvas (Fig. 3F).

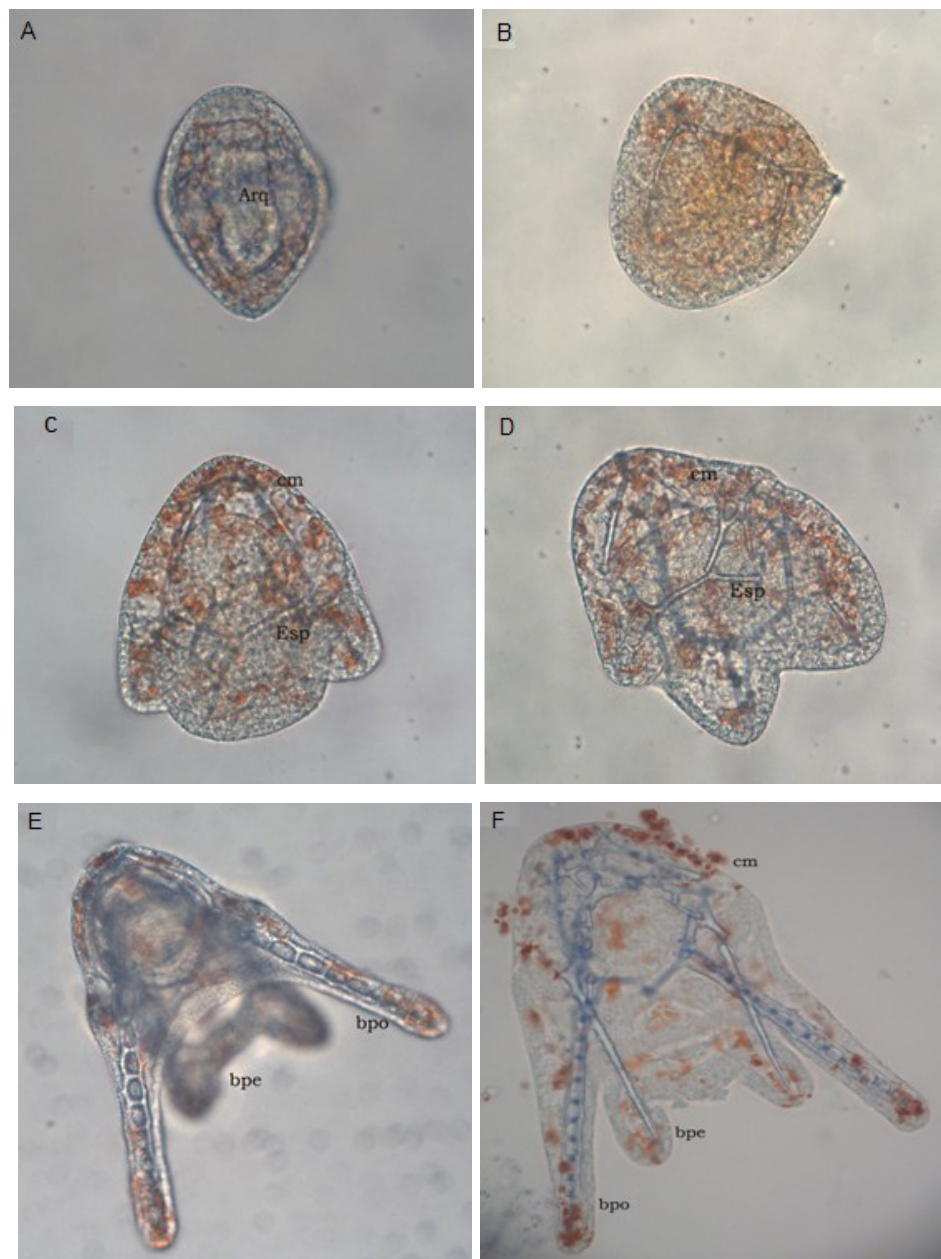
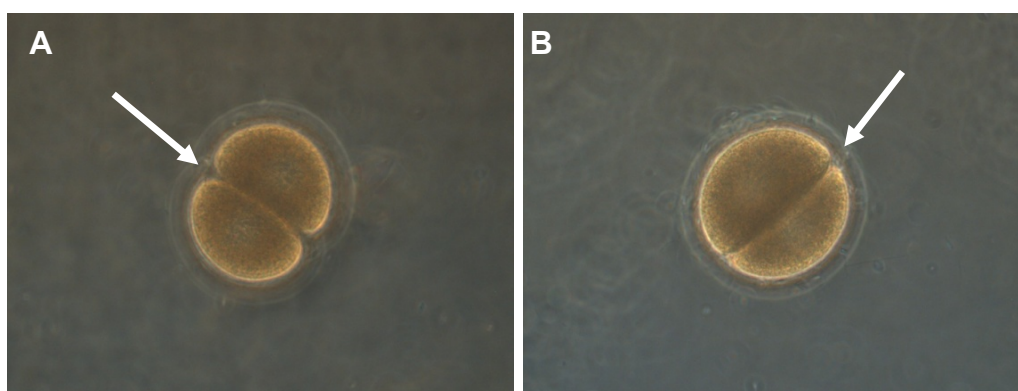


Figura 3. Efeito do Py-09 na morfologia de embriões em estágios tardios do desenvolvimento embrionário. (A) Grupo controle - gástrula; (B) Grupo tratado – gástrula; (C) Grupo controle – Prisma; (D) Grupo tratado – Prisma; (E) Grupo controle – Larva Plúteo; (F) Grupo tratado – Larva Plúteo. Fotomicrografias representativas de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Objetiva 40x. Arq – arquêntero; cm – células pigmentares; Esp – espículas; bpe – braço pré-oral; bpo – braço pós-oral.

4.1.5 Efeito do Py-09 no padrão de clivagem holoblástica dos embriões

Foram analisadas as alterações no padrão de clivagem das células embrionárias. No grupo controle, tanto nos estágios de 2 e 4 células, observou-se o padrão típico de clivagem holoblástica (Fig. 4A e 4C). No grupo tratado com o Py-09, observou-se que uma segmentação desigual das células embrionárias. No estágio de 2 células (Fig. 4B), o plano de clivagem não encontra-se no plano medial do zigoto, enquanto que na segunda divisão celular (Fig. 4D), pode-se observar que o embrião apresenta 3 células de tamanhos distintos, ao invés de 4 células de tamanhos idênticos.



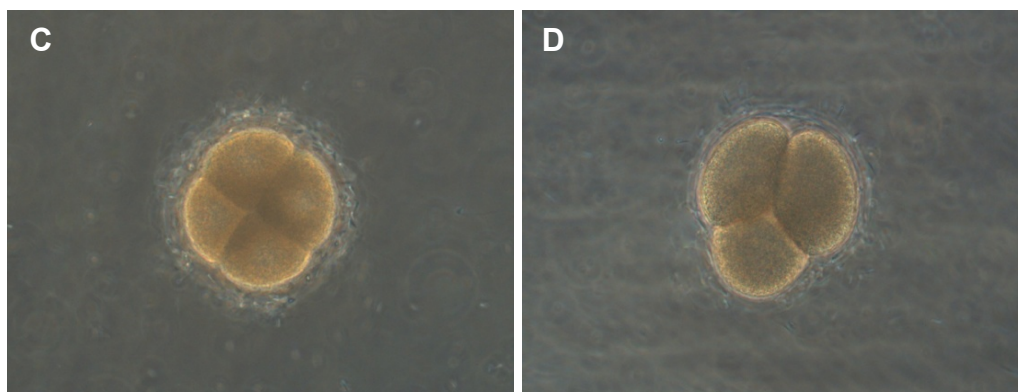


Figura 4. Efeito do Py-09 no padrão de clivagem holoblástica no estágio 2 e 4 células. (A) Estágio de 2 células - Grupo controle; (B) Estágio de 2 células - Grupo tratado. (C) Estágio de 4 células - Grupo controle; (D) Estágio de 4 células - Grupo tratado. Fotomicrografias representativas de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Objetiva 40x. Setas indicam o plano de clivagem da célula embrionária.

4.2 Efeito do Py-09 sobre os parâmetros celulares

4.2.1 Efeito do Py-09 sobre o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) de células embrionárias

No intuito de investigar o efeito do Py-09 sobre o $\Delta\Psi_m$ de células embrionárias, os embriões, tratados ou não com o Py-09, foram incubados com DiOC₆(3), uma sonda fluorescente e sensível à variações no $\Delta\Psi_m$. O grupo controle apresentou um padrão de fluorescência pontuado (Fig. 5B e 6B), característico de um $\Delta\Psi_m$ íntegro. De modo diferente, os embriões tratados com o Py-09 apresentaram uma distribuição difusa da sonda no citosol, indicando colapso do $\Delta\Psi_m$ (Fig. 5D e 6D).

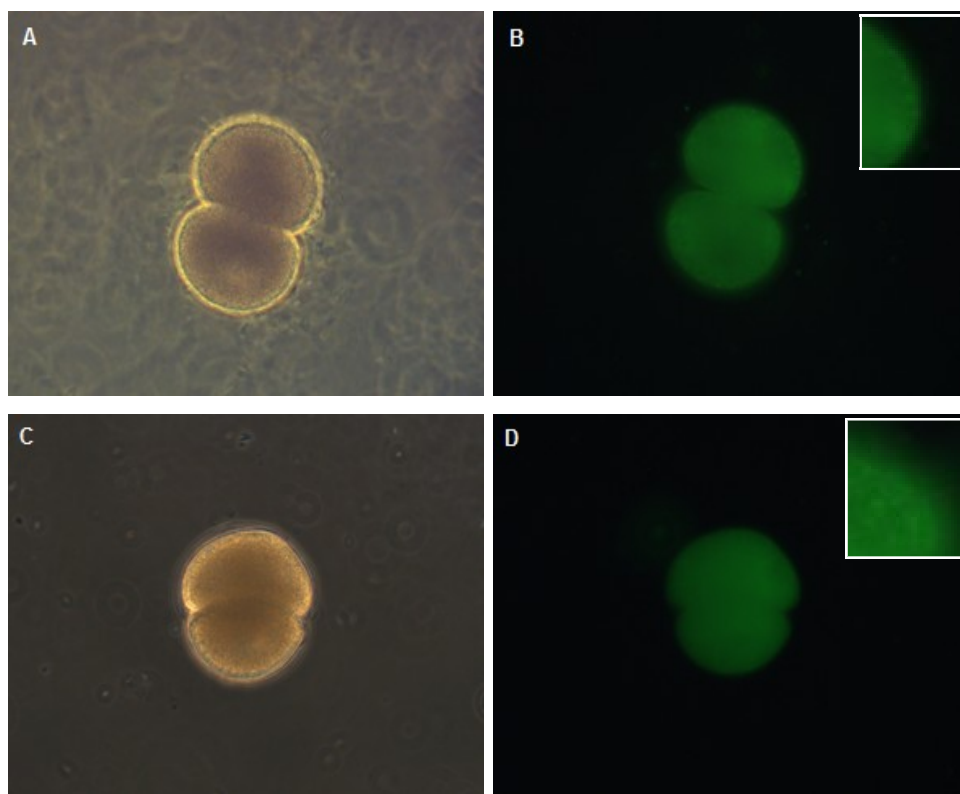
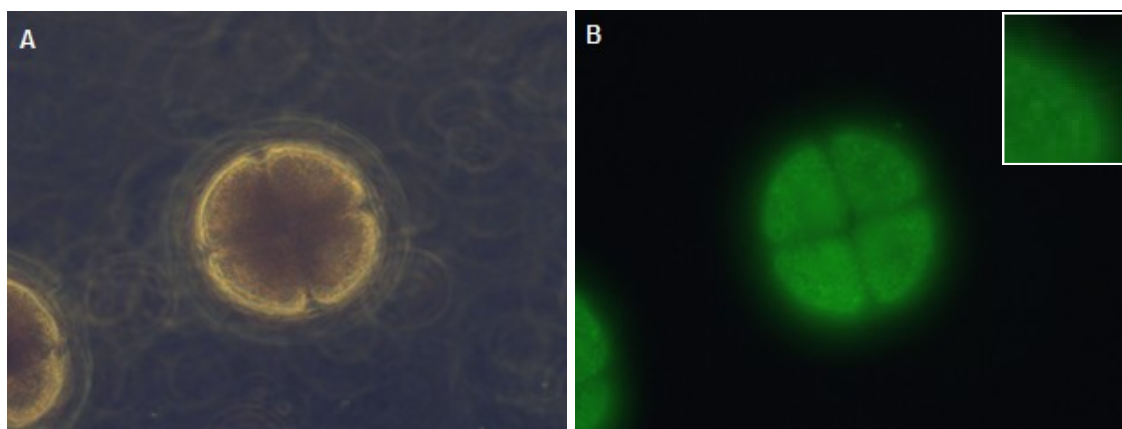


Figura 5. Efeito do Py-09 sobre o $\Delta\Psi_m$ em embriões de 2 células. (A, B) Grupo controle; (C, D) Grupo tratado com Py-09 (12,5 μM). (A, C) Microscopia de Contraste de Fase; (B, D) Microscopia de Fluorescência. Fotomicrografias representativas de 3 experimentos realizados em duplicata e de maneira independente. Objetiva 40X. Os quadros inseridos nas figuras 5B e 5D representam um detalhe das células com aumento de 10x na imagem original.



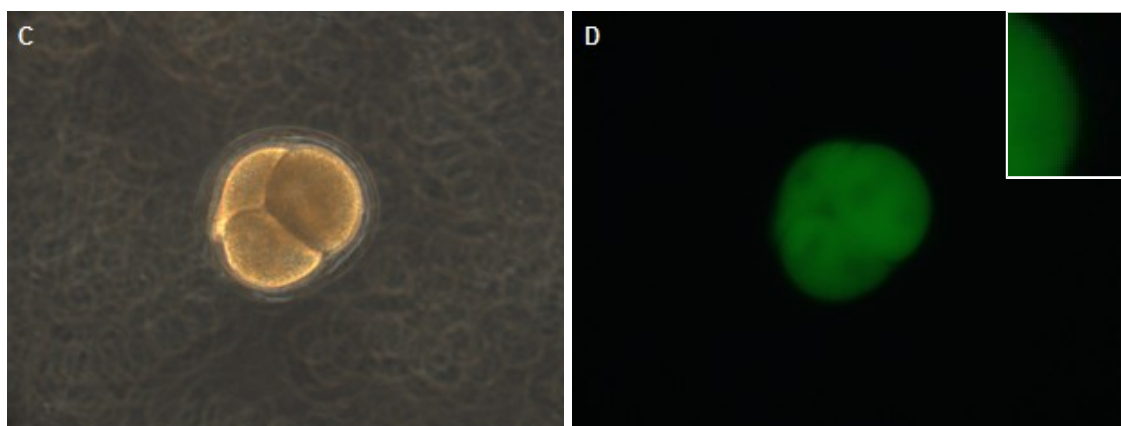


Figura 6. Efeito do Py-09 sobre o $\Delta\Psi_m$ em embriões de 4 células. (A, B) Grupo controle; (C, D) Grupo tratado com Py-09 (12,5 μM). (A, C) Microscopia de Contraste de Fase; (B, D) Microscopia de Fluorescência. Fotomicrografias representativas de 3 experimentos realizados em duplicata e de maneira independente. Objetiva 40X. Os quadros inseridos nas figuras 6B e 6D representam um detalhe das células com aumento de 10x na imagem original.

Adicionalmente, foi realizada a contagem diferencial das células (Tab. 1), considerando o desenvolvimento como normal, anormal e embriões não desenvolvidos (com ou sem padrão pontuado de fluorescência). No grupo controle, houve a predominância do desenvolvimento normal (padrão de clivagem normal) e um padrão pontuado de fluorescência, com índices de desenvolvimento entre 80% (estágio de 2 células) à 90% (estágio de 4 células). No grupo tratado com o Py-09, foi observada uma maior incidência de clivagem anormal das células e um atraso no desenvolvimento dos embriões. O desenvolvimento anormal, com padrão de fluorescência difuso, variou entre 31% (estágio 2 células) e 40% (estágio 4 células). Já a predominância de embriões com desenvolvimento atrasado foi de 28% (estágio 2 células) a 25% (estágio 4 células).

Desenvolvimento Embrionário	Grupo Controle				Py-09			
	2 células		4 células		2 células		4 células	
	PNT	D	PNT	D	PNT	D	PNT	D
Padrão de Clivagem Normal	80	8	90	8	8	10	12	5
Padrão de Clivagem	0	0	0	0	4	31	6	40

Anormal								
Desenvolvimento	4	8	2	0	19	28	12	25
Atrasado								

Tabela 1. Relação entre o padrão de clivagem e o perfil de fluorescência do DiOC6₃ em embriões no estágio de 2 e 4 células. Os valores representam o número de embriões com padrão de fluorescência pontuado (PNT) e difuso (D) nos estágios de 2 células (90 min) e 4 células (120 min). Py-09: 12,5 µM. Os dados representam 3 experimentos realizados em duplicata e de maneira independente. Os valores representam a percentagem de células em cada padrão de clivagem ou estado do desenvolvimento.

4.2.2 Efeito do Py-09 sobre o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) de óvulos

Os óvulos marcados com a sonda fluorescente TMRE e tratados somente com FCCP (agente despolarizante, controle positivo) (Fig. 7C) ou com a associação FCCP e MK571 (bloqueador do transportador ABCC1) (Fig. 5D), apresentaram um padrão de fluorescência difusa, distinto do padrão pontuado observado nos óvulos não-tratados (Fig. 7A). Os óvulos tratados com Py-09 apresentaram um padrão de fluorescência pontuado (Fig. 7E), semelhante ao observado no grupo controle.

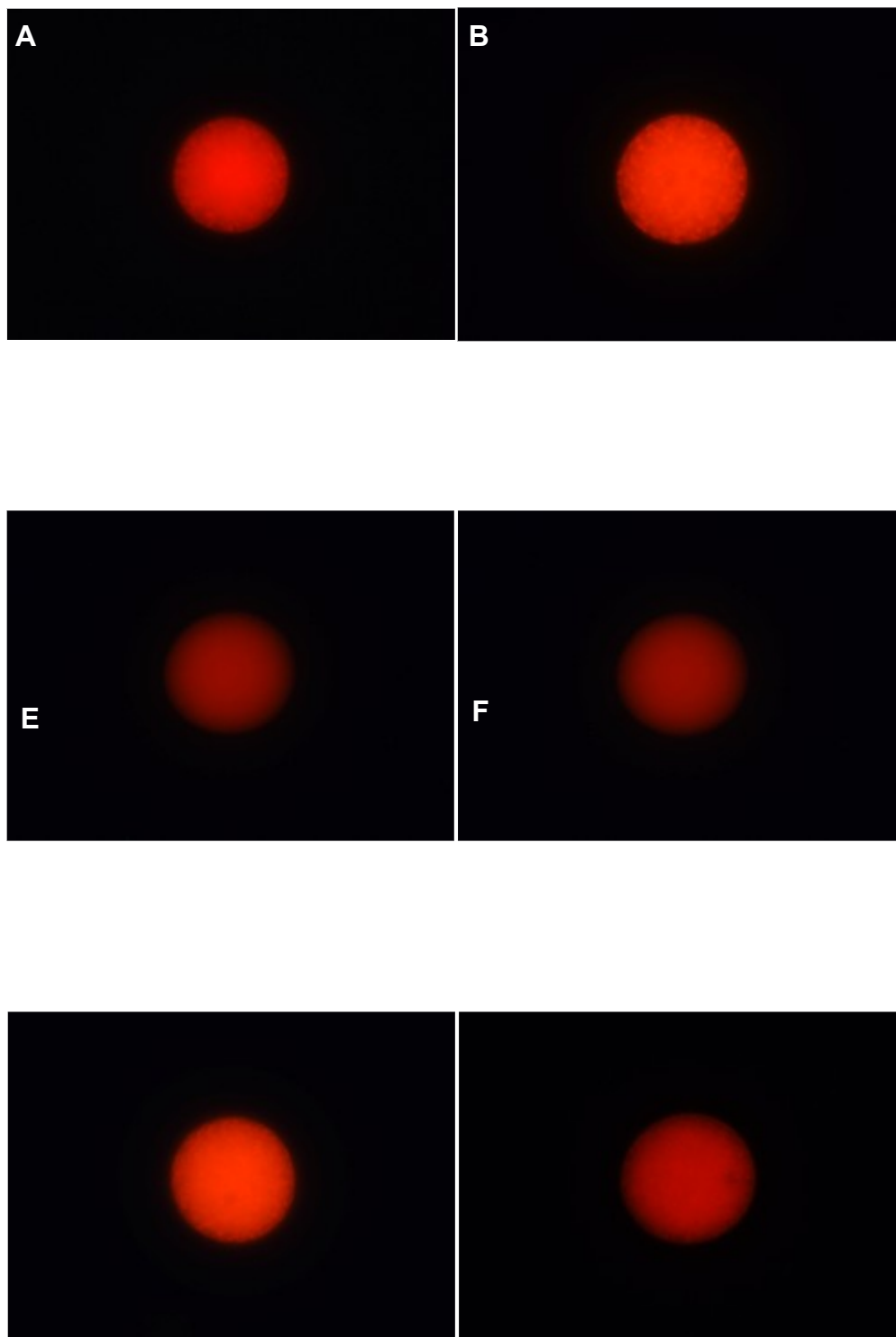


Figura 7. Efeito do Py-09 sobre o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) de óvulos. Fotomicrografias representativas de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente; **(A)** Grupo controle; **(B)** Grupo tratado com

MK, 5 μ M; **(C)** Grupo tratado com FCCP, 5 μ M; **(D)** FCCP+MK; **(E)** Py-09, 12,5 μ M; **(F)** Py-09+MK. TMRE 250 μ M. Objetiva 40x

4.2.3 Efeito do Py-09 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células embrionárias

Uma vez demonstrado o efeito despolarizante do Py-09 sobre a membrana mitocondrial interna, analisamos se este evento induziria alteração na produção de ROS. Os embriões foram tratados com a sonda fluorescente H₂DCFDA, na presença ou ausência de Py-09 (12,5 μ M), e os níveis de ROS monitorados nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (60 e 90 minutos após a fertilização). Em ambos os tempos analisados, não houve diferença significativa na média de intensidade de fluorescência (MIF) da sonda indicadora de ROS quando comparados os grupos controle e tratado (Fig. 8, Gráf. 5; Fig. 9 e Gráf. 6).



Figura 8. Efeito do Py-09 na produção de ROS 60 minutos após a fertilização. **(A)** Grupo controle; **(B)** Controle Positivo – Peróxido de Hidrogênio; **(C)** Py-09. Fotomicrografias representativas de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Objetiva 40x.

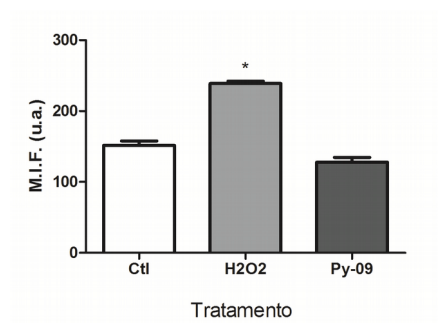


Gráfico 5. Efeito do Py-09 na produção de ROS no tempo de 60 minutos após a fertilização. Média da Intensidade de Fluorescência (M.I.F.); Ctl: Grupo controle; H₂O₂, 1mM:(controle positivo); Py: Py-09 12,5 µM. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. *p < 0,05, quando comparado ao grupo controle (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Pode-se observar, ainda, no estágio de 2 células, a diferença no padrão de clivagem holoblástica entre o grupo controle e o grupo tratado com o composto em estudo (Fig. 7C).

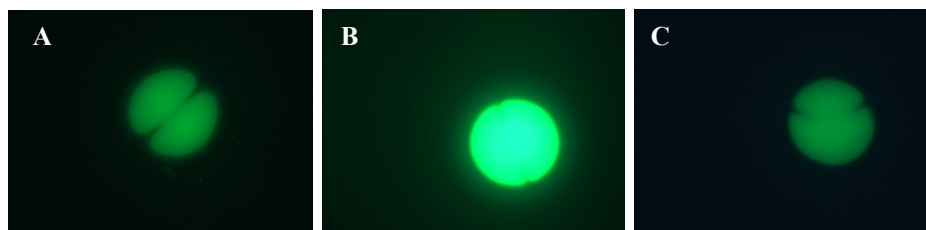


Figura 9. Efeito do Py-09 na produção de ROS no tempo estágio 2 células. (A) Grupo controle; (B) Controle Positivo – Peróxido de Hidrogênio; (C) Py-09. Fotomicrografias representativas de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Objetiva 40x.

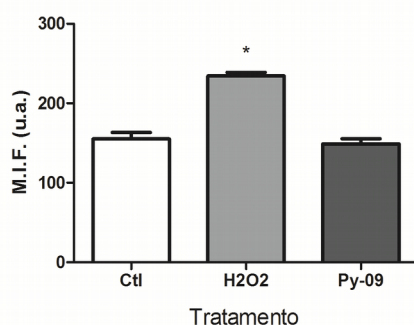
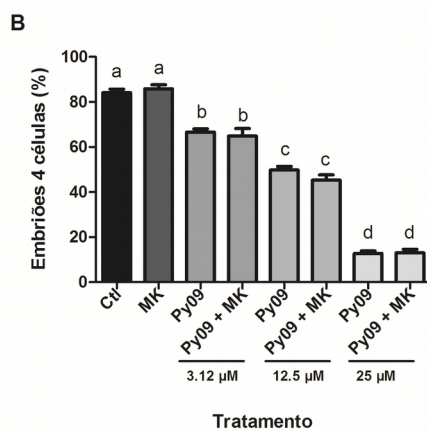
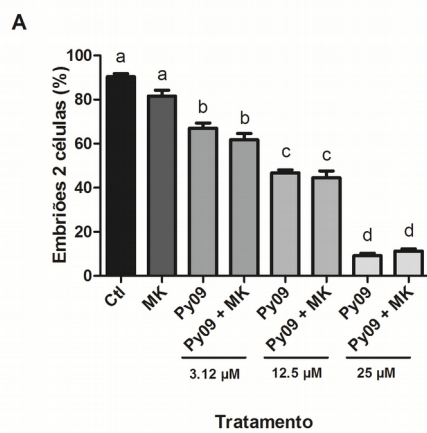


Gráfico 6. Efeito do Py-09 na produção de ROS no estágio 2 células. Média da Intensidade de Fluorescência (M.I.F.); Ctl: Grupo controle; H₂O₂, 1mM (controle positivo); Py: Py-09 12,5 µM. Os dados representam média ± EPM de pelo menos 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. *p < 0,05, quando comparado ao grupo controle (One-way ANOVA seguido pelo pós- teste de Tukey).

4.3 Efeito do Py-09 sobre a atividade de proteínas ABC e o fenótipo MXR

4.3.1 Efeito da associação do Py-09 com o MK571 sobre o desenvolvimento embrionário

Com o intuito de investigar se o efeito inibitório do Py-09 sobre o desenvolvimento embrionário é afetado pela atividade do transportador ABCC1, foi realizado o ensaio de associação do composto em estudo com o MK571 (10 µM), um inibidor da proteína ABCC1. O MK571 foi associado com 3 concentrações distintas do Py-09: 12,5 µM, que corresponde à CE₅₀, 3,12 µM e 25 µM, que inibem 20% e 80% do desenvolvimento embrionário, respectivamente. A associação com o MK571 não alterou o efeito inibitório do Py-09 sobre o desenvolvimento embrionário em nenhuma das associações realizadas (Gráfico 7).



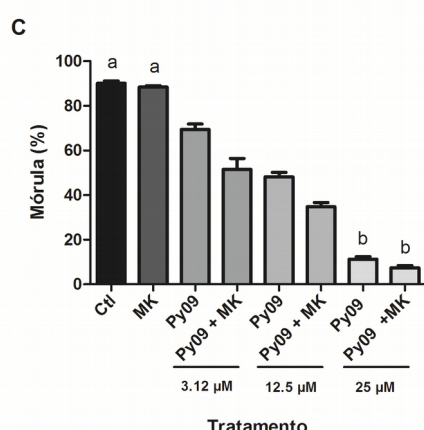
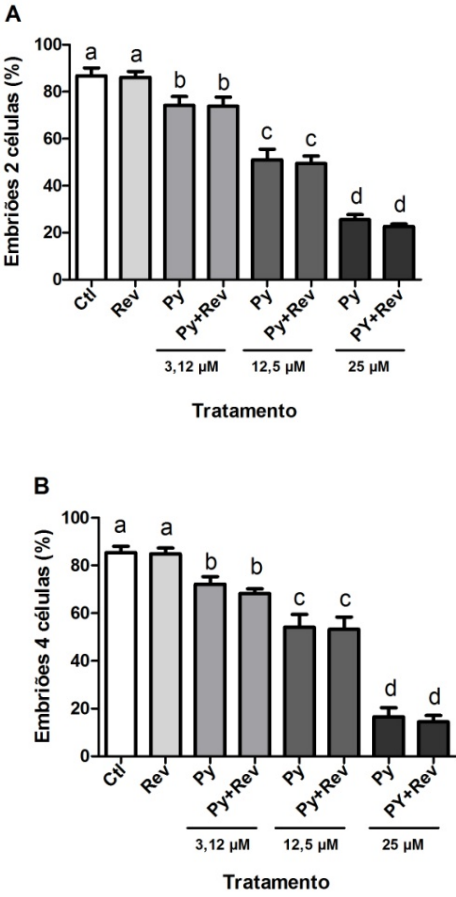


Gráfico 7. Efeito da associação do Py-09 com o MK571 sobre o desenvolvimento embrionário. **A** – Estágio de primeira clivagem; **B** – Estágio de segunda clivagem; **C** – Estágio de mórula. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Grupos de tratamento com letras iguais não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). MK – MK571 10 μ M; Py: Py-09 3,12 μ M/ 12,5 μ M/ 25 μ M.

4.3.2 Efeito da associação do Py-09 com a REV205 sobre o desenvolvimento embrionário

Para investigar se o efeito inibitório do Py-09 sobre o desenvolvimento embrionário é afetado pela atividade do transportador ABCB1, foi realizado o ensaio de associação do composto em estudo com a REV205 (10 μ M), um inibidor da proteína ABCB1. Assim como ocorrido no ensaio de associação com o MK571, não houve diferença significativa no tratamento do Py-09 isolado ou em associação com a REV205 (Gráfico 8).



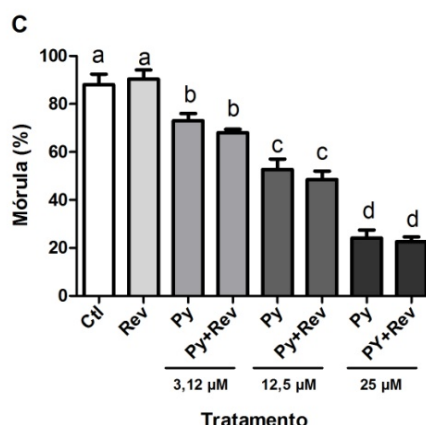


Gráfico 8. Ensaio de associação com inibidores ABC. **A** – Estágio de primeira clivagem; **B** – Estágio de segunda clivagem; **C** – Estágio de mórula. Os dados representam a média, e erro padrão da média $\pm$ EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Grupos de tratamento com letras iguais não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Rev – Reversina 205 10 μ M.

4.3.3 Efeito do Py-09 na atividade de transportadores ABC

Foi analisado, ainda, o efeito do Py-09 sobre a atividade de transportadores ABC, utilizando o ensaio de acúmulo intracelular de Calceína (C/AM). O Verapamil, um bloqueador clássico do transportador ABCB1, foi utilizado como controle positivo. A média da intensidade de fluorescência do grupo tratado com o Verapamil foi de 121.9 ± 4.51 , enquanto que a do grupo controle foi de $47.9 \pm 2,82$ e a do grupo tratado com Py-09 foi de 57.3 ± 3.99 , evidenciando que não houve diferença significativa na intensidade de fluorescência do grupo tratado com o Py-09 quando comparado ao grupo controle (Gráfico 9). Pode-se observar, ainda, a diferença no padrão de clivagem holoblástica entre o grupo controle e o grupo tratado com o composto em estudo (Figura 10).

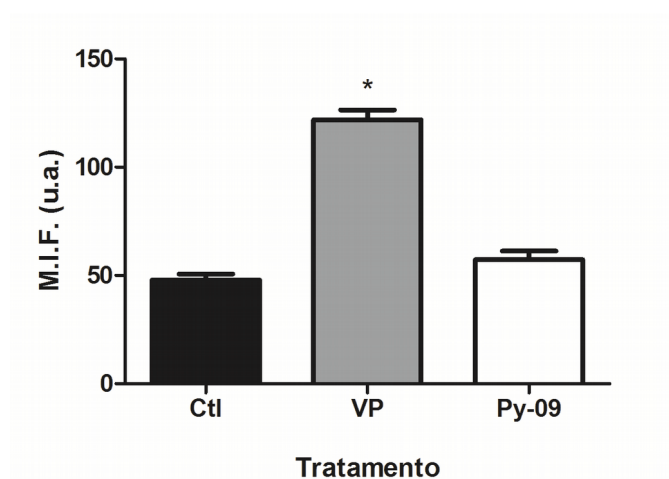


Gráfico 9. Efeito do Py-09 na atividade de transportadores ABC em embriões de 2 células. Média da Intensidade de Fluorescência (M.I.F.); Ctl: Grupo controle; VP: Verapamil, 10 μ M (controle positivo); Py-09: Py-09 12,5 μ M. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (One-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey).



Figura 10. Efeito do Py-09 na atividade de transportadores ABC em embriões de 2 células. (A) Grupo controle; (B) Verapamil; (C) Py-09. Fotomicrografias representativas de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Objetiva 40x.

4.3.4 Efeito da associação do Py-09 e vimblastina no desenvolvimento embrionário

Foi realizada a avaliação da reversão do fenótipo MXR pelo composto Py-09. Para tal, foi realizada a associação do Py-09 com a vimblastina (VB), um antimitótico clássico e conhecido substrato dos transportadores ABC. A associação do Py-09 (12,5 μ M) com a VB (100 e 400 nM, concentrações que inibem em 20% e 80% o desenvolvimento embrionário, respectivamente) não apresentou alterações nos índices de desenvolvimento embrionário (Gráfico 7) em comparação com os compostos isolados.

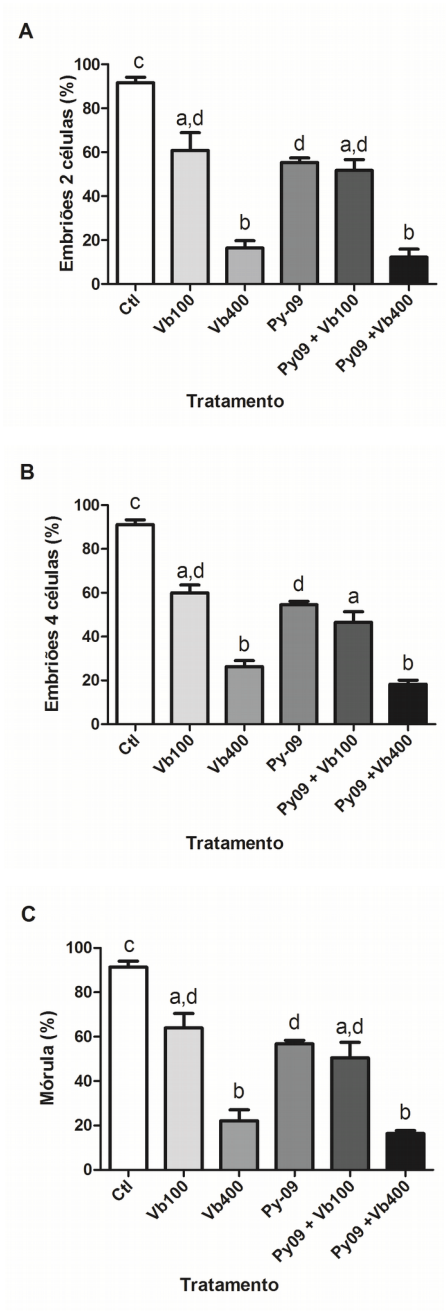


Gráfico 10. Ensaio de reversão do fenótipo MXR. A – Estágio de primeira clivagem; **B** – Estágio de segunda clivagem; **C** – Estágio de mórula. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Grupos de tratamento com letras iguais não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$); Vb100 – Vimblastina 100 nM; Vb400- Vimblastina 400 nM; Py09 12,5 μ M

Discussão

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, investigou-se o efeito de um composto derivado de pirimidinona (Py-09) no desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar, e foi demonstrado os seus efeitos na fertilização, morfologia e fisiologia celular, bem como a sua potencial atividade antimitótica.

As células tumorais exibem taxas de proliferação mais elevadas do que as células normais. Algumas drogas antitumorais, tais como alcaloides da vinca e taxanos, agem sobre os microtúbulos, inibindo a mitose.

No âmbito da investigação de drogas com atividade antimitótica, as células embrionárias de ouriços-do-mar vêm sendo amplamente utilizadas como modelo biológico, devido a várias similaridades com o ciclo celular humano. Isto se deve a diversos fatores que proporcionam a realização de uma vasta gama de ensaios biológicos. (SEMENOVA.; KISELYOV; SEMENOV, 2006).

Recentemente, Stepanov e colaboradores (2015) estudaram em embriões de ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* a atividade biológica de compostos derivados da BIFA (4-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-furazan-3-amina), revelando efeitos antiproliferativos naquele tipo celular e também em linhagens de células tumorais humanas. Ainda, estudos utilizando o modelo de embriões de ouriço-do-mar, demonstraram que análogos da podofilotoxina apresentaram potencial atividade antimitótica via desestabilização dos microtúbulos (SEMENOVA *et al.*, 2014). Estudos do nosso grupo (LEITE *et al.*, 2012), com adutos de Morita-Baylis-Hillman, vêm obtendo resultados promissores utilizando o desenvolvimento embrionário de ouriço-do-mar como modelo experimental para a prospecção de novos compostos sintéticos com atividade antimitótica.

Estudos com derivados de pirimidina relataram diversas atividades farmacológicas, como antitumorais e antifúngicas (BARALDI *et al.*, 2002), bem como antiproliferativa (PÉDEBOSCQ *et al.*, 2010). Relatos mais recentes com derivados de pirimidinona revelaram atividade antimicrobiana (FARYED *et al.*, 2014).

Com base nessas proposições, decidiu-se estudar a atividade farmacológica de um novo composto derivado de pirimidinona (Py-09), observando seus efeitos ao nível celular em gametas e células embrionárias de ouriços-do-mar.

Inicialmente, foi investigado o efeito do Py-09 sobre a fertilização *in vitro*. O tratamento dos óvulos com o Py-09 inibiu a fertilização (Gráfico 2), sugerindo que o composto possa interferir neste evento por meio do impedimento da ativação do óvulo.

A ativação do óvulo é o processo que o torna capaz de sustentar o desenvolvimento do embrião. Em equinodermos e vertebrados, a ativação é induzida no momento da fertilização. A fusão do espermatozoide com o gameta feminino induz o aumento progressivo da concentração citosólica de cálcio no zigoto recém-formado (ROUX *et al.*, 2006). Essa onda de cálcio, ao se propagar pelo zigoto, ativa o metabolismo celular, regulando diversos processos celulares, que culminam na elevação do envelope vitelínico, estrutura glicoproteica que, além de prevenir a polispermia, confere unidade ao embrião (KANEUCHI *et al.*, 2015). Estudos em estrelas do mar e ouriços-do-mar revelaram que os primeiros eventos da fertilização são influenciados por drogas que se ligam à actina e promovem a despolarização ou estabilização dos filamentos formados por esta proteína. Chun e colaboradores (2014) mostraram que o aparecimento da onda de Ca^{2+} foi atrasado em óvulos tratados com citocalasina B, um inibidor da polimerização dos filamentos de actina, afetando, inclusive, a penetração do espermatozoide no óvulo. Estudos adicionais são necessários para verificar o efeito do Py-09 sobre os níveis intracelulares de cálcio nos zigotos.

O Py-09 demonstrou uma marcante atividade antimitótica de maneira dose-dependente (Gráfico 3), apresentando uma CE_{50} de 12,5 μM sobre a progressão para o estágio de primeira clivagem. Este valor é cerca de 15 vezes menor do que o observado em estudos da atividade antimitótica de adutos de Morita-Baylis-Hillman sobre o desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar, onde o composto hidróxi-(4-nitrofenil)metil-acrilonitrila apresentou uma CE_{50} de 180 μM (LEITE *et al.*, 2012). Adicionalmente, verificou-se que o efeito inibitório do Py-09 é maior quando o mesmo é adicionado nos primeiros minutos após a fertilização (Gráfico 4), o que sugere que o composto esteja interferindo com as etapas iniciais do desenvolvimento embrionário, com destaque para a ativação do metabolismo do zigoto, tendo em vista que o maior efeito foi obtido quando o Py-09 foi adicionado no primeiro minuto após o contato dos gametas.

Frente a tais achados, foi investigado, em nível morfológico, o efeito do Py-09 nos estágios do desenvolvimento larval do *E. lucunter*. Os embriões de ouriço-do-

mar são utilizados, de forma bastante sucedida, como modelo biológico para avaliar a toxicidade de estressores químicos que geralmente causam perturbações morfológicas, principalmente malformações no esqueleto da larva plúteo (MATRANGA *et al.*, 2011). Estudos em *P. lividus* mostraram que embriões expostos ao cádmio (Cd), um importante estressor químico, apresentaram ramificações irregulares das espículas e distribuição atípica de células mesenquimais primárias na blastocela (BONAVENTURA *et al.*, 2015). Neste mesmo estudo, a exposição dos embriões ao Cd ou UVB causou um atraso do desenvolvimento embrionário e da formação do esqueleto.

O comprometimento da morfologia dos embriões pode ser explicado pela indução de apoptose em resposta a estresses químicos e físicos. O ciclo celular e a apoptose estão intimamente ligados, e este fenômeno representa um importante papel nos processos de desenvolvimento, determinando a homeostase das populações celulares, sendo desregulado em diversas patologias, dentre elas o câncer (FOTEDAR; DIEDERICH; FOTEDAR, 1996).

No presente estudo, verificou-se que os embriões tratados com Py-09 apresentaram atraso na progressão para o estágio de prisma (Fig. 3D) e alterações morfológicas nos estágios de gástrula (Fig. 3B) e larva plúteo (Fig. 3F). Este resultado sugere que o tratamento dos embriões, após o estágio de blástula, poderia estar induzindo apoptose, comprometendo, assim, o processo de morfogênese. No entanto, estudos adicionais são necessários para a identificação de marcadores moleculares da apoptose. Compostos citotóxicos, como o etoposídeo, aumentaram os índices de apoptose em embriões no estágio de blástula inicial do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus*. Em estágios anteriores ao de blástula, ensaios de alteração da permeabilidade celular, ativação de caspases e fragmentação de DNA, mostraram que os embriões não apresentaram aumentos dos índices de apoptose em comparação ao grupo controle (VEGA; EPEL, 2004). Este fenômeno pode ser análogo aos resultados observados em invertebrados inferiores, nos quais a apoptose induzida ocorre apenas durante uma pequena janela do desenvolvimento, após a transição para blástula (ANDERSON; LEWELLYN; MALLER, 1997; FINKIELSTEIN; LEWELLYN; MALLER, 2001; IKEGAMI; HUNTER; YAGER, 1999).

As alterações morfológicas também podem ocorrer ao nível celular, afetando, principalmente, a clivagem holoblástica durante a divisão celular. Os embriões de ouriços-do-mar sofrem clivagem holoblástica (ou total) nos primeiros estágios do

desenvolvimento. A presença do fuso mitótico durante as sucessivas mitoses que ocorrem ao longo do desenvolvimento embrionário é responsável pela segregação dos cromossomos, e é formada, basicamente, pelos microtúbulos, os quais sofrem uma dinâmica de “crescer e encolher” (VICENTE; WORDEMAN, 2015).

Estudos com embriões de *P. lividus*, tratados com derivados da podofilotoxina, lignana extraída de plantas do gênero *Podophyllum*, mostrou alterações no padrão de clivagem das células embrionárias, apresentando diferentes tamanhos e formas, sugerindo que a atividade antimitótica ocorra por meio da desestabilização da dinâmica dos microtúbulos (SEMENOVA *et al.*, 2011). Tal fato pode explicar as alterações no padrão de clivagem holoblástica dos embriões tratados com o Py-09, os quais apresentaram blastômeros de diferentes tamanhos e formas (Figura 4), sugerindo, assim, que o Py-09 possa estar atuando sobre o processo de organização dos microtúbulos, a partir da desestabilização da tubulina. Estudos adicionais são necessários para o entendimento do mecanismo molecular de ação do Py-09 sobre os microtúbulos.

Frente à esses resultados, passou-se a investigar o efeito do Py-09 na fisiologia celular de óvulos e células embrionárias, com ênfase em parâmetros associados à atividade mitocondrial. A mitocôndria desempenha um papel crucial na manutenção da vida ou no processo de morte celular em óvulos. O “controle de qualidade” no embrião inicial, para determinar se o mesmo irá prosseguir em desenvolvimento ou será rapidamente eliminado, cabe à mitocôndria (DUMOLLARD; DUCHEN; CARROLL, 2007). Neste contexto, a manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é crucial para a integridade mitocondrial e sua função bioenergética (GONDA *et al.*, 2008). Alterações mitocondriais, incluindo a perda do $\Delta\Psi_m$, são eventos chave que ocorrem durante a apoptose induzida por drogas (KAMAL *et al.*, 2014). No entanto, a despolarização da membrana mitocondrial interna não é um evento comum no mecanismo de ação de todos os compostos citotóxicos. Óvulos não-fertilizados de ouriços-do-mar *P. lividus* tratados com estaurosporina - um inibidor não específico de proteínas cinases amplamente usado para induzir apoptose em vários tipos celulares – apresentam colapso do $\Delta\Psi_m$; ao passo que a emetina, um inibidor da síntese de proteínas, não é capaz de induzir a despolarização da membrana mitocondrial interna (PHILIPPE *et al.*, 2014).

O presente estudo utilizou duas sondas fluorescentes na avaliação do potencial de membrana mitocondrial - o DiOC₆(3) e o TMRE - e mostrou que o Py-09

induz a despolarização do $\Delta\Psi_m$ em embriões (Fig.3), mas não em óvulos não-fertilizados (Fig. 7). Isto sugere que estes tipos celulares podem apresentar diferentes mecanismos de indução do colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ou mesmo de resistência à perda do $\Delta\Psi_m$. O colapso do $\Delta\Psi_m$ pode levar à uma diminuição na síntese de ATP, comprometendo assim, uma série de processos celulares dependentes de energia (CHEN, 1988), afetando, desta forma, o desenvolvimento embrionário.

A mitocôndria é a principal organela geradora de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “*reactive oxygen species*”) (MURPHY, 2009), sendo, a produção destas, consequência da liberação de elétrons como subprodutos da cadeia respiratória (KOOPMAN *et al.*, 2010; RIGOULET; YOBOUE; DEVIN, 2011). Tais metabólitos são responsáveis por danos oxidativos ao DNA, RNA, proteínas e lipídios, estando associados ao envelhecimento celular (HARMAN, 1972; MIQUEL *et al.*, 1980; RICHTER; PARK; AMES, 1988; RICHTER, 1992). Apesar do aumento de ROS poder estimular algumas vias essenciais, existe um limiar de concentração dessas espécies que as tornam nocivas para a célula (RIGOULET; YOBOUE; DEVIN, 2011). As mitocôndrias desempenham um papel fundamental no desenvolvimento embrionário, ao atuarem na regulação de vários fatores transcricionais no embrião, os quais são sensíveis ao estado redox e à produção de ROS pela mitocôndria (BROOKES *et al.*, 2004; DUCHEN, 2000; RAHMAN; MARWICK; KIRKHAM, 2004). Assim, uma deficiência na produção de ROS pela mitocôndria pode comprometer a sinalização celular em resposta a fatores de crescimento, por exemplo (HANDY *et al.*, 2009; LOH *et al.*, 2009). Por outro lado, a geração de ROS intracelular é considerada um dos mediadores da sinalização que pode levar à morte celular induzida por muitos agentes antitumorais (TORRES *et al.*, 2008).

Os níveis de ROS em embriões tratados com o Py-09 foram os mesmos observados em embriões não-tratados (Fig.8, Gráf. 5 e Fig.9, Graf. 6). Tais dados sugerem que o efeito antimitótico do Py-09 seja independente dos níveis intracelulares de ROS. Estes resultados vão de encontro com estudos realizados em diferentes linhagens celulares humanas utilizando análogos de combrestatina (um composto fenol natural), a qual é bem conhecida como ligante do sítio da colchicina na tubulina, e que inibe a polimerização dos microtúbulos, resultando aumento nos níveis de ROS e parada da proliferação celular (KAMAL *et al.*, 2014). O fato do Py-

09 não promover um aumento na produção de ROS, na mesma concentração capaz de inibir 50% da divisão celular das células embrionárias, pode estar relacionado ao tipo celular estudado.

Tendo em vista a potencialidade da atividade antimitótica do Py-09, que o caracteriza como um candidato a ser utilizado em novos estudos sobre seu potencial uso como quimioterápico, é de suma importância analisar o perfil farmacológico do composto em estudo, com relação ao seu comportamento frente ao fenótipo de resistência à múltiplas drogas (MDR, do inglês “*multidrug resistance*”).

O fenômeno MDR constitui o maior obstáculo para o sucesso da quimioterapia de tumores humanos, sendo responsável pelo insucesso de vários protocolos de tratamento (ECKFORD; SHAROM, 2009). A MDR é conferida por proteínas de membrana denominadas de transportadores ABC (do inglês, “*ATP-binding cassettes*”), pela sua habilidade em executar o efluxo de quimioterápicos. Em células de vertebrados e invertebrados marinhos, os transportadores ABC são responsáveis pelo fenômeno MXR (do inglês, “*multixenobiotic resistance*”) e desempenham papéis importantes na proteção contra xenobióticos. Eles são a primeira linha de defesa contra estressores químicos e físicos em óvulos de células embrionárias de ouriços-do-mar (DE ARAUJO LEITE *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2010; EPEL *et al.*, 2008; HAMDOUN *et al.*, 2004). Os subtipos desses transportadores que estão tipicamente envolvidos com o efluxo de xenobióticos são das subfamílias ABCB, ABCC e ABCG (VEHNIÄINEN; KUKKONEN, 2015). A inibição da atividade destas proteínas pode causar o acúmulo intracelular de substâncias químicas, deixando, assim, embriões susceptíveis a seus efeitos tóxicos (WU *et al.*, 2015). Desta forma, foi investigado se efeito inibitório do Py-09 sobre o desenvolvimento embrionário era afetado pela atividade dos transportadores ABCC1 e ABCB1.

Nosso estudo demonstrou que a associação do Py-09 com o MK571 (inibidor de ABCC1) ou Reversina 205 (inibidor de ABCB1) não alteraram o efeito inibitório do composto sobre o desenvolvimento embrionário (Gráficos 7 e 8). Esses dados mostram que o Py-09 não é substrato dos transportadores ABCC1 (Gráfico 7) ou ABCB1 (Gráfico 8). Tal característica é desejada em novos compostos com potencial quimioterápico (ECKFORD; SHAROM, 2009), o que torna o Py-09 mais atraente para novos estudos sobre o seu potencial antitumoral.

Adicionalmente, por meio do ensaio de acúmulo intracelular de calceína, foi investigado se o Py-09 atuaria como um bloqueador da atividade de transportadores ABC. O tratamento dos embriões com Py-09 não alterou o acúmulo intracelular de calceína em comparação com grupo controle (Gráfico 9), o que demonstra que o Py-09 não inibe a atividade de transportadores ABC (Figura 10). Este dado é relevante, sob o ponto de vista farmacológico, uma vez que as proteínas ABC apresentam uma expressão constitutiva em diversos tecidos humanos, e o seu bloqueio pode levar à comprometimentos fisiológicos graves, incluindo falência renal ou neurotoxicidade, além de conferir ao composto uma baixa probabilidade de afetar a biodisponibilidade de outros xenobióticos/drogas cuja absorção/distribuição tecidual seja mediada pelas proteínas ABC (ECKFORD; SHAROM, 2009).

Várias abordagens para driblar a quimiorresistência de tumores com fenótipo MDR têm sido exploradas, incluindo as que combinam produtos naturais, ou compostos sintéticos, com paclitaxel ou outros agentes quimioterápicos. Assim, decidiu-se avaliar a reversão do fenótipo MXR pelo Py-09. Estudos prévios demonstraram que as células embrionárias do *E. lucunter* apresentam o fenótipo MXR, podendo, assim, serem utilizadas na prospecção de compostos capazes de reverter o fenômeno de resistência (DE SOUZA *et al.*, 2010). Desta forma, foi investigado o efeito da associação do Py-09 com o quimioterápico vimblastina, um alcaloide da vinca de uso comum na terapia do câncer e conhecido substrato dos transportadores ABC. Os resultados mostraram que a associação Py-09/vimblastina não foi capaz de aumentar o efeito antimitótico dos compostos *per se* (Gráfico 10). Esses dados confirmam que o Py-09 não é capaz de inibir a atividade de transportadores ABC e nem de reverter o fenótipo MXR/MDR.

Em suma, o presente trabalho revelou uma marcante atividade antimitótica do composto Py-09, estimulando a realização de novos estudos que permitam o conhecimento do mecanismo de ação do composto, visando sua aplicação futura como ferramenta farmacológica para estudos *in vitro*, ou mesmo para seu uso na terapêutica do câncer.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O Py-09 apresenta uma marcante atividade antimitótica tempo e dose-dependente, promovendo alterações morfológicas - como o padrão de clivagem dos blastômeros e malformações em embriões e larvas - e fisiológicas - alterações no potencial de membrana mitocondrial - , bem como seu perfil farmacológico, no âmbito de que o composto não é substrato de proteínas ABC nem influencia na funcionalidade destas estruturas, o faz um promissor composto para ser investigado no tratamento do câncer, sendo necessários estudos para verificações específicas de sua ação frente a células tumorais humanas.

Referências

Referências

Anexos