



AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS CITOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DE COMPOSTOS QUÍMICOS AROMÁTICOS ANTI-PRÍON

¹Hana de Jesús Galiza Gomes (IC-CNPq); ²Eduardo Kennedy Carrão Dantas (doutorado-CAPEs); ³Natalia do Carmo Ferreira; ³Yraima Moura Lopes Cordeiro; ²Israel Felzenszwalb, ²Andreia da Silva Fernandes; ¹Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira (orientador).

1 – Departamento de Biologia Molecular e Celular; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2 – Departamento de Biofísica e Biometria; Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes; Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

3 – Departamento de Biotecnologia Farmacêutica; Faculdade de Farmácia; Universidade do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq, CAPES.

Palavras-chave: EET; Citotoxicidade; Mutagenicidade; Anti-prion;

A proteína priônica pode ser encontrada em mamíferos e embora suas funções biológicas não sejam plenamente conhecidas, sabe-se que desempenham papel importante na manutenção da saúde neuronal e na modulação da plasticidade sináptica, cruciais para o pleno funcionamento cerebral. Quando mal dobradas, a proteína priônica saudável (PrP^C) se transforma em proteína priônica scrapie com capacidade de resistir as enzimas proteolíticas. Desta forma, se acumulam e formam agregados insolúveis no cérebro, dando origem às Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET). Estas causam alterações motoras e cognitivas, levando a uma neurodegeneração fatal.

O surgimento das EET pode ser oriundo de causas genéticas, esporádicas ou adquiridas. Embora possa levar anos até a manifestação clínica, a partir do momento em que sintomas podem ser percebidos, estima-se que o indivíduo possua até 13 meses de vida. Não há terapia eficiente para o tratamento e por acometer um a cada 1 milhão (atribuindo a ela a classificação de doença rara), dificulta no desenvolvimento de terapias eficientes, visto que a condução dos ensaios clínicos é limitada.

Compostos aromáticos foram apontados por ensaio *in silico* como promissores e ao serem testados em células da linhagem N2A (neurônios de murinho), apresentaram comportamento promissor no que diz respeito a redução da PrSC em células infectadas. As plataformas ChemSilico e Osiris previram ausência de mutagenicidade para os compostos J20 e J35, enquanto a Osiris e ACD/Percepta apontaram que os compostos Y13 e Y17 não apresentaram nenhum ou baixo potencial de mutagenicidade.

Por isso, o objetivo geral do presente estudo se baseou na análise da atividade dos compostos aromáticos anti-scrapie oriundos de diferentes classes químicas, a saber acilidrazonas, oxidiazóis e chalconas. Os compostos são:



J8, J20, J35, Y13 e Y17. Os objetivos específicos foram: avaliar o potencial mutagênico das amostras e avaliar o potencial citotóxico em células tumorais.

A metodologia utilizada para análise da mutagenicidade foi o Ensaio de Salmonella/Microsossoma, mais conhecido como Teste de Ames, utilizando as cepas TA98, TA100, TA102 e TA1535 da linhagem de *Salmonella enterica sorovar* Typhimurium na presença e ausência de metabolização exógena, isto é, S9 mix (homogenato de fígado de rato). Com a cepa incubada previamente no dia anterior ao ensaio, o erlenmeyer contendo a cultura bacteriana foi retirada do shaker. Em cada tubo de ensaio, foram adicionados 500µL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4) para o ensaio sem metabolização exógena e 500µL para o ensaio com metabolização exógena, seguido de 100µL das amostras nas concentrações 5, 10, 20, 40 e 80µM, bem como 100µL de controle negativo que foi DMSO e 100 µL de controle positivo. Por último, foram adicionados 100µL de cultura bacteriana e após 20 minutos de incubação, o conteúdo com top ágar e LB foi vertido em placas de meio mínimo e após solidificado, foram incubadas à 37°C por 60 horas.

Para a avaliação de citotoxicidade, foi realizado o ensaio de sal tetrazólico solúvel em água (WST-1), utilizando a linhagem celular HepG2 (hepatocarcinoma humano). Em placas de 96 poços, foi realizada a cultura celular adicionando 200µL de suspensão com densidade de $1,5 \times 10^4$, tendo como controle positivo o Triton X-100 10% e controle negativo o DMSO. Foram transferidos 100µL do sobrenadante e transferida para outra placa estéril e após a lavagem de cada poço com PBS 1x, foi adicionada uma solução do reagente (100 µL de meio DMEM + 10% de WST). O tempo de tratamento para ambos os ensaios foram de 24, 48 e 72 horas e para a leitura, utilizou-se o espectrofotômetro a 450 nm.

Para a análise dos dados de todos os ensaios, foi utilizado o One-way ANOVA e pós-teste colerativo de Bonferroni para a determinação das diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,05$).

A amostra J8 apresentou um comportamento dose-dependente, onde o aumento da concentração resultou na diminuição do número de colônias, o que pode sugerir uma ação citotóxica induzida por J8 na presença e ausência de S9 para a cepa TA98, TA100 e TA1535 – nesta última, foi observado comportamento mutagênico. Para a cepa TA102, houve o aumento no número de colônias induzidas, dessa vez havendo o comportamento dose-dependentes associado ao aumento da mutagenicidade, visto que para que haja o aumento de colônias, antes é necessário que as células bacterianas voltem a sintetizar histidina.

A amostra J20 não apresentou mutagenicidade (definida pelos seguintes critérios: $IM > 2$; curva dose-resposta; e análise estatística) para as cepas TA98, TA100 e TA102 – para esta cepa, houve a diminuição de colônias na maior concentração, sugerindo citotoxicidade. Para a cepa 1535, houve potencial mutagênico com $IM > 2$ nas concentrações de 10 e 40µL/mL sem S9 e $IM > 2$ para todas as concentrações experimentadas, sendo a amostra mutagênica para a cepa testada.

A amostra J35 demonstrou comportamento citotóxico para as cepas TA98 e TA100. Para a cepa TA102, o $IM = 1$ para praticamente todas as concentrações testadas, apresentando baixa mutagenicidade tanto na presença quanto na ausência de metabolização exógena. Houve mutagenicidade para a cepa TA1535 com S9 mix, apresentando citotoxicidade evidenciada pela presença de colônias em baixas concentrações de 10 a 80µL/mL.

A amostra Y13 apresentou um comportamento sugestivo para a citotoxicidade nas cepas TA98 e TA100. Para a cepa TA102 não houve mutagenicidade conforme os critérios estabelecidos para tal, tanto na presença quanto na



ausência de S9 mix. Por último, para a cepa TA1535, foi observado um comportamento dose-resposta na ausência de metabolização exógena, entretanto, os números de colônias ficaram abaixo do CN. Na presença de S9 mix, foi visto um comportamento semelhante, mas superando o CN, sendo percebida mutagenicidade na concentração de 20µL/mL seguida de uma queda abrupta de colônias, indicando citotoxicidade evidenciada pela presença de colônias peti para as concentrações de 40 e 80µL/mL.

Por último, a amostra Y17 houve a indicação de potencial mutagênico baseado no $IM > 2$ para 80 µL/mL na presença de metabolização exógena na cepa TA98. Entretanto, de uma forma geral, o número de colônias induzidas foi menor que o CN tanto na presença, quanto na ausência de metabolização exógena – isto foi visto na TA98 e TA100. Para a TA102, foi observado um aumento gradativo à medida que aumentou-se a concentração, mas não foi o suficiente atender os critérios que apontam para mutagenicidade. Na cepa 1535 foram observadas colônias peti em todas as concentrações com S9, indicando citotoxicidade. As concentrações de 20 e 40 µL/mL foram mutagênicas, enquanto na concentração de 80 µL/mL a amostra foi citotóxica.

Quanto a viabilidade celular, em 72 horas de tratamento do ensaio de WST-1, todas as amostras foram citotóxicas na maior concentração. Na concentração de 40 µL/mL, as amostras J20, J35, Y13 e Y17 apresentaram 70% de citotoxicidade. Em 20 µL/mL, as mesmas amostras reduziram a viabilidade celular em mais de 50%.

Sendo assim, os resultados para o ensaio de modelo bacteriano indicam que os compostos indicam mais de um tipo de mutação, mutações estas aumentadas na presença de metabolização exógena. O ensaio WST indica redução significativa da viabilidade celular em longos períodos de exposição. Pode-se concluir que os compostos testados apresentaram efeitos mutagênicos e citotóxicos – o compromete a sua utilização a longo prazo.

Referências:

- AMES, Bruce N. **The detection of chemical mutagens with enteric bacteria**. Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection. Volume 1, p. 267-282, 1971.
- CARROLL, J.; CHESEBRO, B. Neuroinflammation, Microglia, and Cell-Association during Prion Disease. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 65, 15 jan. 2019.
- COSTA, A. L.; SILVA-JÚNIOR, A. C. Prions: Uma revisão de suas propriedades bioquímicas e das características patológicas das encefalopatias espongiformes transmissíveis. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v. 1, n. 1, p. 04-13, 20 jun. 2018.
- EFSA**. European Food Safety Authority. **Mutagenicidade**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/pt/glossary/mutagenicity#:~:text=A%20capacidade%20de%20causar%20altera%C3%A7%C3%B5es>>. Acesso em: 14 ago. 2024.
- Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis | Concise Medical Knowledge**. Disponível em: <<https://www.lecturio.com/pt/concepts/encefalopatias-espongiformes-transmissiveis/>>. Acesso em: 21 maio. 2024.
- FERREIRA, N. C. *et al.* Anti-Prion Activity of a Panel of Aromatic Chemical Compounds: In Vitro and In Silico Approaches. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e84531, 6 jan. 2014.
- IMRAN, M.; MAHMOOD, S. An overview of human prion diseases. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, dez. 2011.
- KOVAČ, V.; ČURIN ŠERBEC, V. Prion Protein: The Molecule of Many Forms and Faces. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1232, 1 jan. 2022.
- SALVADORI, D. M. F. *et al.* **DA TOXICOGENÉTICA A TOXICOGENÔMICA**. Atheneu: 2021.