

Universidade Federal do Ceará
Unidade Multiusuário NPDM

**Avaliação das atividades citotóxica, moduladora e da resposta
inflamatória de derivados sintéticos oxadiazóis em macrófagos**

1. Informações do Projeto

Proponente: ROBERTO NICOLETE

CPF: 28364306804

Comitê de Ética: CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

2. Descrição

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) até 2025 surgirão 20 milhões de novos casos de câncer, deste total 80% em países em desenvolvimento, evidenciado o grande problema de saúde pública que enfrentarão. A projeção de novos casos para o Brasil no 2020-2021 é cerca de 650 mil, acompanhando a tendência mundial que apresenta maior incidência nos homens do câncer de próstata e nas mulheres do câncer de mama. A quimioterapia é o tratamento mais comumente utilizado, porém não é raro o aparecimento de resistência tanto de origem intrínseca quanto adquirida. Na tentativa de desenvolver novos compostos terapêuticos com máximo efeito citotóxico e mínimo efeito colateral, as pesquisas buscam moléculas capazes de promoverem alterações sítios específicos e somente nas células tumorais. Os compostos abordados neste estudo pertencem ao grupo dos derivados sintéticos do anel 1,2,4-oxadiazol, onde a diss substituição nas posições 3 e 5 produz ganho de atividade antitumoral pelos compostos resultantes, demonstrada em trabalhos já publicados. Principal população de células fagocitárias, os macrófagos estão na linha de frente no combate à micro-organismos patogênicos, são peças chave na regulação da imunidade inata e adquirida, bem como importantes mediadores no metabolismo sistêmico, hematopoiese, angiogênese, apoptose e desenvolvimento de malignidade. Em tumores sólidos malignos, os macrófagos representam mais de 50% do infiltrado de leucócitos, naturalmente estas células ganham importância como eventuais alvos para tratamento destes tipos de tumores. Os macrófagos utilizados no estudos serão derivados da medula óssea (MDMOs) dos fêmures e tíbias de camundongos da linhagem c57bl/6. A confirmação da diferenciação utilizará os marcadores de superfície celular F4/80+, CD11b e CD206. Estes marcadores também permitem identificar se os macrófagos estão na forma não ativada M0, na forma ativada pela via clássica M1 ou ativada pela via alternativa M2. Tanto a polarização quanto a repolarização para algum dos fenótipos será avaliada antes e depois do tratamento com solução contendo as moléculas em estudo e em variadas concentrações. Também será avaliada a citotoxicidade das células pelo método do MTT e possível via de morte celular utilizando os marcadores anexina V e 7-AAD pela citometria de fluxo. Em etapa seguinte, será realizado o co-cultivo dos macrófagos diferenciados com a linhagem de melanoma murino B16 e dosagem das

citocinas produzidas em resposta a este microambiente tumoral na presença e ausência dos compostos derivados oxadiazóis em estudo. O desenvolvimento deste projeto conta com o fomento, colaboração técnica e utilização das estruturas físicas da FIOCRUZ-CE e ainda com a parceria do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do NPDM.

3. Justificativa de Uso

Para a realização das análises por citometria de fluxo previstas no projeto, necessitamos acesso ao laboratório de citometria de fluxo e ao equipamento FACSVerse. O projeto foi enviado e aprovado pela comissão de ética no uso de animais CEUA-UFC n. 9676290319.

Após obtenção da medula óssea dos camundongos, a etapa de diferenciação das células imaturas em macrófagos maduros envolve a cultura destas com sobrenadante de cultura de fibroblastos murinos da linhagem L929, rico em fatores estimuladores de colônias de macrófagos. Os macrófagos maduros, expressam em sua superfície celular as moléculas F4/80, CD11b e CD206. A utilização de marcadores acoplados com fluorocromos e utilizando a citometria de fluxo, permitem que os lasers excitem os fluorocromos, emissão de luz e identificação do macrófago e seu fenótipo.

Será utilizado o corante 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para avaliar a integridade da membrana, a densidade e a morfologia celular. Esse corante penetra nas células cuja membrana esteja rompida e se liga ao DNA, emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência. Serão obtidas informações sobre densidade, morfologia (espalhamento frontal e lateral da luz, o que corresponde ao tamanho e granulosidade relativa entre as células, respectivamente) e integridade de membrana celular, utilizando-se o filtro para o espectro vermelho.

O detergente Triton-X será utilizado juntamente com o 7-AAD para permeabilizar a membrana das células, permitindo a análise do conteúdo e fragmentação do DNA. Como já dito, células com o DNA íntegro emitem alta fluorescência. Núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos 7-AAD e, por isso, emitem menor fluorescência, sugestivo de apoptose. Além disso, o 7-AAD consegue intercalar proporcionalmente a quantidade de DNA da célula, podendo então mensurar as fases do ciclo celular através da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo celular.

A externalização da fosfatidilserina (FS) caracteriza um dos primeiros estágios do processo de apoptose. Esse ensaio permite diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas pela coloração diferencial por fluorescência. Anexina-V é uma proteína conjugada à ficoeritrina (PE), emite fluorescência verde quando ligada a fosfolípidos voltados para o meio extracelular, permitindo identificar as células em processos de morte.

Para confirmação da diferenciação dos macrófagos e fenótipo assumido usaremos os seguintes marcadores já adquiridos:

*PE anti-mouse F4/80; FITC anti-mouse/human CD11b; Alexa Fluor® 647 anti-mouse CD206 (MMR)

Para investigação da via de morte celular usaremos o seguinte marcador já adquiridos:

*PE Annexin V Apoptosis Detection Kit 7-AAD

4. Participantes do Projeto

Participante 1

Nome: Héverton Mendes Araújo

Email: hevertonn.mendes@gmail.com

Participante 2

Nome: Vanessa Pinheiro Gonçalves Ferreira

Email: pinheiro.vanessaf@gmail.com

Participante 3

Nome: José de Brito Vieira Neto

Email: neto.vieira38@gmail.com