

CLÁUDIA DE LOURDES SORAGGI



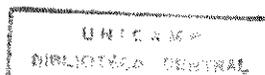
**CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS  
DE  $\beta$ -ENAMINOCETONAS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA EDWIGES HOFFMANN**

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, UNICAMP, PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS,  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOQUÍMICA.

**CAMPINAS**

**1997**



9708147

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Claudia de Lourdes Soraggi  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

28/05/97

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP
	5068c
V.	Ex.
TOMBO BC/	31007
PROC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/07/97
N.º CPD	

CM-00098828-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

**Soraggi, Cláudia de Lourdes**

So68c Citotoxicidade de derivados de  $\beta$ -Enaminocetonas em células de mamíferos/ Cláudia de Lourdes Soraggi. -- Campinas,SP:[s.n.], 1997.  
83f: illus.

Orientadora: Maria Edwiges Hoffmann  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

1. Fibroblastos. 2. Relação estrutura-atividade. 3. Toxicidade.  
I. Hoffmann, Maria Edwiges. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Citotoxicidade de Derivados  
de  $\beta$ -Enaminocetonas em Células de Mamíferos**

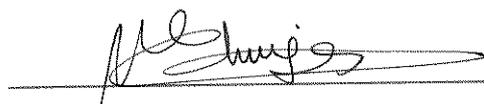
CLÁUDIA DE LOURDES SORAGGI

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, em 28 de maio de 1997, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Bioquímica.

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fernandes Denardi

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jean-Luc Gesztesi

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann (orientadora)

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Marcela Haun (Suplente)

**Este trabalho foi realizado no**  
***Laboratório de Toxicologia Celular e Molecular,***  
**do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia,**  
**da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.**

*A suprema Liberdade é poder deixar-se ser  
possuído pelo sentimento do Amor.*

*O Amor é a própria consciência da existência:  
a crença nas forças divinas, que cuidam de todo o universo  
e que nos levam um ao outro,  
com a mesma fluidez com que aproximam  
uma nuvem de uma montanha,  
que nos proporcionam uma força sobre-humana,  
que dão energia ao vento, ao mar e à chuva  
e que nos tornam grandes como pinheiros gigantescos.*

*Aos meus queridos pais,  
**Dormélia Maria e José,**  
pessoas exemplares  
com as quais aprendi a viver e amar,  
numa atmosfera de bons princípios  
e valores,*

*aos meus queridos irmãos,  
**Caetano, Maria Elisa,  
Sandra, Rildo e  
Marcelo,**  
com os quais convivo  
nesta atmosfera e  
na melhor forma de amar,*

*e ao Pedro Paulo "in memoriam",  
meu grande amigo  
e  
companheiro.*

## AGRADECIMENTOS

À *Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann*, pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação, através da qual os conceitos de ensino e pesquisa foram realmente bem aplicados. Agradeço ainda pelo apoio e a amizade compartilhada, principalmente nos momentos difíceis, quando conhecemos os verdadeiros amigos.

Aos *Profs. Drs. Fernandes Denardi, Hernandes F. Carvalho* e à *Profa. Dra. Marcela Haun*, pela participação na banca examinadora de qualificação e análise prévia deste trabalho, com oportunas correções e sugestões.

Aos *Profs. Drs. Fernandes Denardi e Jean-Luc Gesztezi*, membros integrantes da banca examinadora, pela pronta aceitação em prestigiarem o nosso trabalho.

Ao *Prof. Dr. Antonio Cláudio Herrera Braga* e à *Profa. Dra. Maria Inês Nogueira de Camargo Harris*, pelo fornecimento dos compostos sintetizados no departamento de Química Orgânica, I.Q., Unicamp e fundamentais para este trabalho, além da colaboração sempre que foi necessária para a realização deste projeto.

Aos professores, colegas e às secretárias *Miriam Balthazar, Marina Andressa e Andréa Vigilato*, do departamento de Bioquímica, I.B., Unicamp, pelos auxílios e facilidades que foram proporcionadas para a conclusão deste trabalho, assim como aos professores membros da SCPG-Bioquímica (96-98), pelo apoio e incentivo na finalização deste trabalho.

À secretária *Silvia (CPG-IB)*, pelas colaborações e facilidades, quando necessárias, em algumas situações pertinentes à esta tese.

À *Sra. Maria Alice Berton Guadagnini*, pela convivência agradável, onde a sua presença tranquila e o trabalho exemplar sempre foram marcantes, além daquela paz que nos transmitia.

Ao *Jean-Luc Gestezi, Ana Mijares Arévalo, Maristela Freitas Pereira Bittencourt* e *Maria Silvia Capucci-Sierig*, pelos bons tempos em que convivemos juntos nesse laboratório, onde a alegria e o companheirismo daquele período foi muito marcante em nossas vidas.

À *Denise Balduino Ciampi* e à *Nadja Cristhina de Souza-Pinto*, pela amizade compartilhada em todos os momentos. A convivência saudável do dia-a-dia e a colaboração de vocês foram imprescindíveis para dar sustentação às adversidades que atravessei durante este período.

À *Marlene Fortunato Mendes*, sempre tão amiga e presente, companheira desde a concepção até a finalização deste trabalho.

Ao *José Mauro Granjeiro*, pela amizade e colaborações fundamentais na área de informática, sempre que foram necessárias.

À *Márcia Marília Fagian Pansani*, pelas colaborações sempre que se fizeram necessárias e pela paz que nos transmite, quando nos visita para o café diário.

À *Paola Rocha Gonçalves*, pelos auxílios prestados e pela colaboração na ilustração dessa tese.

À *Edu Hoffmann, Denise Ciampi, Marlene Fortunato, Nadja Cris, Karina Ckless, Neusa Narita, Simone Fanan, Juliana Félix, Luciana Ansante, Maria Inês Harris, Daniel Rettori, Ana Cláudia Lessinger, Alexandre Costa, Rafael de Castro, Ana Paula Dias e Terezinha da Cunha Moraes*, pessoas tão próximas e queridas, com as quais exercitei e exercito a arte de conviver e de aprender, de que cada dia é importante e que é através destas experiências que nos tornamos cada vez mais importantes uns aos outros. Obrigada pela manutenção solidária de todos ao laboratório, local privilegiado por nós.

Às companheiras de todas as horas, *Edi Sartorato, Norma Pivetta, Maria Regina Calil, Mônica Farias e Elãene Machado Vieira*, pelos laços de profunda amizade que nos unem.

Às minhas cunhadas *Ângela, Andréa e Eliete*, pelo carinho, e aos meus sobrinhos, *Carlos, Bruno, Rafael, Victor e Renan* pelos pureza dos sentimentos que transmitem.

À *Família Santi Baggio*, pela dedicação e carinho que sempre me receberam e em especial à *Rosineide*, amiga fiel em todas as horas.

À *Família Norkus, Marcelo, Neide e Marina*, pela sinceridade e carinho de sua amizade.

Ao querido amigo, *Oswaldo Maurício Varella*, pela atenção e alegria nestes bons tempos de convivência juntos. À *Márcia*, pela amizade descontraída e alegre.

Ao *Joel Rosostollato*, pela presença alegre em tempos importantes.

À *Família Labate Pires de Campos*, pelo apoio e solidariedade nos momentos difíceis, além do carinho e consideração que sempre tiveram.

Ao *Rocco Ansante*, pela oportunidade de receber transmissões muito especiais.

Ao *Egberto Foot Guimarães*, "in memoriun", pelo carinho com que sempre me envolveu.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra, material ou espiritualmente, me ajudaram nos momentos mais difíceis e a *Deus*, acima de tudo, pois sem a sua energia nada disso seria possível.

# ÍNDICE

## AGRADECIMENTOS

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ABREVIATURAS	v
I. INTRODUÇÃO.....	01
I.1. <i>Ensaio in vitro</i> .....	03
I.2. <i>Relação Estrutura e Atividade Citotóxica</i> .....	08
I.3. <i>Derivados de <math>\beta</math>-Enaminocetonas</i> .....	10
II. OBJETIVOS.....	13
III. MATERIAIS & MÉTODOS.....	16
III.1. <i>Reagentes</i> .....	17
III.2. <i>Soluções Especiais</i> .....	18
III.3. <i>Cultura de Células</i> .....	19
III.4. <i>Medida da Liberação da Enzima Desidrogenase Láctica (LDH), por Células V79</i> .....	20
III.5. <i>Medida da Inibição da Proliferação Celular</i> .....	22
III.6. <i>Medida da Captação do corante Vermelho Neutro</i> .....	23
III.7. <i>Medida da Inibição da Taxa de Síntese de DNA</i> .....	24
IV. RESULTADOS.....	26
IV.1. <i>Padronização da Técnica de Liberação de Lactato desidrogenase (LDH), por fibroblastos V79</i> .....	27

<i>IV.2. Determinação da Citotoxicidade de Álcoois e de Derivados de <math>\beta</math>-Enaminocetonas, através da Captação de Vermelho Neutro.....</i>	<b>34</b>
<i>IV.3. Inibição da Proliferação Celular de Fibroblastos V79.....</i>	<b>40</b>
<i>IV.4. Inibição da Taxa de Síntese de DNA em Células V79.....</i>	<b>47</b>
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>VII. ANEXO.....</b>	<b>81</b>

## RESUMO

Estudos sobre as relações de estrutura e atividade citotóxica tem sido essenciais para o desenvolvimento de novas drogas farmacológicas. Neste trabalho nós investigamos a citotoxicidade de uma série de novas estruturas relacionadas a compostos sintéticos, denominados  $\gamma$ -aminoálcoois : 2-pentanol-benzilamina (*PBA*) e 2-pentanol-fenilamina (*PPA*), e as tetrahydro-1,3-oxazinas correspondentes : 2-pentanol-benziloxazina (*PBO*) e 2-pentanol-feniloxazina (*PPO*). A relevância biológica dos  $\gamma$ -aminoálcoois e seus derivados é devida à sua vasta aplicação farmacológica. Primeiramente, nós analisamos a citotoxicidade de alguns compostos padrões como: *Álcool Alílico*, *Butanol-1* e *Heptanol-1* em culturas de células V79 (fibroblastos de hamster chinês), por diferentes técnicas *in vitro*. O método que apresentou maior sensibilidade para as análises de citotoxicidade dos álcoois estudados, foi o ensaio da proliferação celular, o qual utilizamos para as avaliações de toxicidade celular dos  $\gamma$ -aminoálcoois *PBA*, *PPA* e seus derivados *PBO* e *PPO*, respectivamente. As potências relativas de toxicidade foram comparadas, através da determinação dos valores de  $ID_{50}$ , (dose requerida para induzir 50% de inibição), obedecendo a seguinte ordem:

**PPO>PBO>Heptanol1>PBA>PPA>Butanol1>A.Alílico**

Também analisamos a atividade de cada composto sintetizado em relação à inibição da taxa de síntese de DNA. A síntese de DNA foi determinada pela medida da incorporação de [ $^3$ H]-timidina nas culturas expostas.

Os resultados nos mostraram que as oxazinas *PBO* e *PPO*, comportaram-se como potentes inibidores sobre a síntese de DNA para células V79, enquanto que os  $\gamma$ -aminoálcoois *PBA* e *PPA* afetaram fracamente a taxa de síntese, na mesma faixa de concentração (0,5-5,0 mM) e que as oxazinas derivadas dos  $\gamma$ -aminoálcoois, *PBO* e *PPO* são agentes genotóxicos potentes para fibroblastos V79, indicando que a atividade antireplicativa destes compostos está provavelmente relacionada com a ciclização das moléculas, apontando assim para o possível uso destes derivados de  $\gamma$ -aminoálcoois como agentes antineoplásicos.

## ABSTRACT

Studies on structure-activity relationships are essential for the development of new pharmacological drugs. In this work we have investigated the cytotoxicity of new structurally related synthetic compounds, the  $\gamma$ -aminoalcohols 2-pentanol-4-benzylamine (**PBA**), 2-pentanol-4-phenylamine (**PPA**) and the corresponding tetrahydro-1,3-oxazines, 2-pentanol-4-benzyloxazine (**PBO**) and 2-pentanol-4-phenyloxazine (**PPO**). The biological relevance of  $\gamma$ -aminoalcohols and derivatives is based on their wide pharmacological application. We have firstly analysed the cytotoxicity of standard compounds to cultured hamster cells (V79 line), the alcohols *Butanol-1*, *Heptanol-1* and *Allyl Alcohol*, by measuring of different endpoints. The Growth Inhibition Assay was the most sensitive endpoint to evaluate alcohols cytotoxicity. For this reason it was been used for evaluation of the  $\gamma$ -aminoalcohols *PBA*, *PPA* and the oxazines *PBO*, *PPO*, respectively. The relative potencies were compared by determining the midpoint cytotoxicity, or  $ID_{50}$  value (dose required to induce 50% inhibition) for each compound. Accordind to this, it was obtained the following order:

**PPO>PBO>Heptanol-1>PBA>PPA>But-1>A. Alcohol**

We analysed further the activity of each synthetic compound upon DNA synthesis in V79 cells. The DNA synthesis rate was determined by measuring  $^3H$ -thymidine uptake in exposed cultures.

The results showed that the oxazines **PBO** and **PPO** were potent inhibitors of DNA synthesis in V79 cells, while the  $\gamma$ -aminoalcohols **PBA** and **PPA** affected only slightly the rate of synthesis, in the same concentration range (0.5-5.0 mM). These results indicate that the antireplicative activity of these oxazines is probably related to molecular cyclization.

Our data point to the possible use of the oxazines **PBO** and **PPO** as antineoplastic agents.

## ABREVIATURAS

- $A_{(*)}$ : absorvância no comprimento de onda especificado no parêntese  
 CPM: contagens por minuto  
 $Cr^{51}$ : cromo 51  
 DNA: ácido desoxirribonucléico  
 DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco  
 DMSO: dimetilsulfóxido  
 EDTA: sal dissódico de ácido etilenodiamino tetraacético  
 $^3H$ -tdr: timidina tritiada  
 $ID_{50}$ : concentração que inibe 50% do crescimento celular  
 LDH: desidrogenase láctica  
 MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio  
 NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo  
 NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida  
 NR: vermelho neutro (“neutral red”), 2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina  
 $NR_{50}$ : concentração que inibe 50% da captação de vermelho neutro  
 PBA: pentanolbenzilamina  
 PBO: pentanolbenziloxazina  
 PBS-A : solução salina tamponada com fosfato  
 $PBS-Ca^{2+}$ : solução salina tamponada com fosfato, acrescida de cálcio  
 PPA: pentanolfenilamina  
 PPO: pentanolfeniloxazina  
 PPO/POPOP : 2,5-difenil oxazol/p-bis[2-(5-fenil oxazoil/-benzeno)]  
 RNA: ácido ribonucléico  
 SAR: relação estrutura-atividade  
 SFB: soro fetal bovino  
 TCA: ácido tricloroacético  
 Triton X-100 : octil fenoxi polietoxietanol  
 $UI_{50}$ : concentração que inibe 50% da captação de uridina  
 V79 : fibroblastos de pulmão de hamster chines  
 3T3: fibroblastos de rato (BALB/c)

## **I. INTRODUÇÃO**

*Citotoxicidade* é a medida do potencial de um agente causar injúria celular. Todos os agentes tem a capacidade de serem citotóxicos, dependendo da concentração e do tempo de exposição dos mesmos. Os efeitos citotóxicos (danos celulares), se suficientemente intensos, poderão comprometer a viabilidade da célula perturbando sua integridade estrutural e/ou metabólica, a sua integridade reprodutiva, causando inibição da divisão celular ou morte celular (*Shaw, 1994*).

Substâncias tóxicas podem induzir diferentes efeitos deletérios nas células, tais como : alterações na morfologia; lesões na membrana; perdas de atividades metabólicas, viabilidade e adesão; inibição do crescimento celular; danos no material genético (genotoxicidade) e morte celular. Na maioria dos casos, ocorrem efeitos sinérgicos entre todos estes processos. Quando alguma substância tóxica perturba a estrutura das membranas biológicas, por exemplo, ocorrem mudanças de permeabilidade, alterando portanto, os processos de transporte de água, íons e metabólitos. Esses eventos podem finalmente levar à lise celular e a morte da célula (*Cornelis et al., 1991; Groth et al., 1995*).

O aumento do uso de substâncias químicas tem melhorado a qualidade da vida humana na sociedade moderna. Associados aos efeitos benéficos das substâncias químicas ocorrem frequentemente efeitos adversos, ao nível do meio ambiente e da saúde humana (*Chu, 1995*). Assim, a expansão do número de substâncias causou um grande aumento da demanda de ensaios biológicos necessários para a avaliação das atividades toxicológicas destas substâncias (*Committee, 1975; Weatherall, 1982; Ekwall e Ekwall, 1988*;

*Chiu, 1993; Clothier et al., 1995; Groth et al., 1995; Bruner et al., 1996; Clemedson et al., 1996).*

Nos países desenvolvidos a aplicabilidade de uma nova substância está, hoje, condicionada à realização de uma série de ensaios biológicos para assegurar a inexistência de efeitos tóxicos e genéticos da droga para a população e para o meio ambiente.

### **I.1. ENSAIOS *in vitro***

A identificação dos riscos na utilização das substâncias químicas pelo homem levou a um consumo massivo de animais experimentais. Isso por sua vez, levou ao desenvolvimento de modelos *in vitro* para avaliações toxicológicas. A disponibilidade de várias metodologias para a avaliação da toxicidade *in vitro*, como alternativas à utilização do uso de animais, tem estimulado à sua procura para se predizer a toxicidade de novas substâncias.

Diferentes ensaios para avaliação da toxicidade celular foram desenvolvidos, baseados em uma variedade de parâmetros de susceptibilidade à ação de diferentes toxinas (*Tardiff, 1978 ; Ekwall, 1980; Nardone, 1980; Ekwall, 1983; Rowan & Goldberg, 1985; Frazier, 1990; Loprieno et al., 1993).*

Adicionalmente aos interesses científicos envolvidos no desenvolvimento de métodos alternativos, há também as razões éticas, as quais justificam a necessidade de reduzir o uso de modelos com animais,

nos programas de avaliação de toxicidade ( *Mull et al., 1976; Stvenson, 1979; Golberg, 1986; Gad, 1990; Del Raso, 1993; Frazier, 1993; Loprieno, et al., 1994*). A utilização dos ensaios *in vitro* tem sido recomendada numa fase preliminar, com o objetivo de se predizer o potencial de risco de uma substância para o homem.

As alternativas *in vitro* tem muitas vantagens sobre os testes *in vivo*, tais como: simplicidade, rapidez, diminuição dos custos efetivos e redução do número e do sofrimento dos animais utilizados. Os métodos *in vitro* fornecem também maiores e melhores controles sobre as condições experimentais, permitindo assim, uma melhor reprodutibilidade experimental (*Chu, 1995*).

A atual disponibilidade de uma variabilidade de linhagens celulares em bancos internacionais tornou possível a larga utilização de modelos *in vitro*, levando a um avanço rápido da padronização de métodos alternativos para avaliações toxicológicas. Numerosas técnicas *in vitro* foram desenvolvidas para avaliações de citotoxicidade e genotoxicidade de drogas, utilizando-se células de mamíferos em cultura (*Tardiff, 1978; Ekwall, 1980; Clothier et al., 1995; Chu, 1995; Clemedson et al., 1996*). Baterias de ensaios foram propostas e programas inter-laboratoriais foram estabelecidos para se aferir a reprodutibilidade e validade dos ensaios (*Balls & Horner, 1985; Shopsis et al., 1985; Knox et al., 1986; Bondenson et al., 1989; Ekwall et al., 1989; Balls et al., 1990; Balls, 1992; Balls et al., 1995*).

Os métodos *in vitro* mais utilizados na atualidade são os seguintes:

## ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

### I - EFEITO LETAL

Curvas de sobrevivência

### II - EFEITO CITOTÓXICO

#### II. 1 - Nível da integridade da membrana

Liberação de enzimas citoplasmáticas - LDH

Liberação de Cr<sup>51</sup> (incorporado em proteínas)

Exclusão de corantes - azul de tripan

#### II. 2 - Nível da Síntese de macromoléculas

Incorporação de <sup>3</sup>H - timidina no DNA

Incorporação de <sup>3</sup>H - uridina no RNA

Incorporação de <sup>3</sup>H - aminoácidos em proteínas

#### II. 3 - Nível do crescimento celular

Inibição da proliferação celular

#### II. 4 - Nível da atividade funcional de organelas

Captação de vermelho neutro pelos lisossomos

Redução do MTT pelas mitocôndrias

Dentre as numerosas possibilidades de linhagens celulares disponíveis, a linhagem V79 de fibroblastos de hamster chinês tem sido largamente utilizada em ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade (*Bradley et al., 1981; Fentem et al., 1992; Slamenova et al., 1992; Toroason et al., 1992; Fry et al., 1993; Jansson & Jansson, 1993; Capucci et al., 1995b; Clothier et al., 1995; Clemedson et al., 1996*). Algumas características desta linhagem são: a alta velocidade de proliferação, a alta eficiência de clonagem, a estabilidade do cariótipo e a manutenção das características após a criopreservação. A linhagem V79 tem sido utilizada com sucesso em nosso laboratório para o desenvolvimento de estudos de citotoxicidade (*Arévalo, 1990; Capucci, 1990; Gesztesi, 1990; Souza-Pinto, 1993; Arévalo et al., 1996; Ckless, 1996; Souza-Pinto et al., 1996; Souza-Pinto, 1997*).

Além das avaliações de potencial de risco, os modelos *in vitro* com culturas de células são particularmente adequados para o desenvolvimento de estudo sobre os mecanismos de ação de drogas, de grande importância para as áreas farmacológica e médica. A droga é uma substância ou mistura de substâncias destinada ao uso nos diagnósticos, tratamento, atenuação ou prevenção de uma doença ou estado físico anormal nos homens ou animais (*Chu, 1995*).

Em consequência do avanço tecnológico ocorrido nas últimas décadas inúmeras novas substâncias químicas (drogas) tem sido planejadas e sintetizadas visando uma aplicação farmacológica ou industrial (*Maugh, 1978; Weatherall, 1982*). Este contingente de novas substâncias químicas

vem aumentando cada vez mais, com o desenvolvimento de programas computadorizados para a seleção de novas moléculas baseados em estudos da relação estrutura-atividade, e também com o desenvolvimento de novos produtos através de técnicas de engenharia genética.

Alguns programas de metodologias *in vitro* tem a finalidade do desenvolvimento e posterior validação dos ensaios que, provavelmente poderão ser utilizados para a obtenção de informações nas avaliações de substâncias químicas individuais (ingredientes) ou combinações de substâncias químicas (formulações) (*Gettings, 1992; Gettings et al., 1996*).

Esforços consideráveis vem sendo realizados nos últimos anos no sentido da validação dos métodos alternativos *in vitro*, visando sua aceitação no campo científico, e a regulamentação dos procedimentos, para que possam ser aceitos pelos órgãos de controle e saneamento. Isto possibilitaria uma redução considerável do número de animais de laboratório e uma excelente reprodutibilidade, reforçando assim a relevância (*Balls, 1992; Walum et al., 1994; Balls et al., 1995; Clothier et al., 1995*).

A utilização dos modelos *in vitro* para avaliações toxicológicas tem sido recomendada para os estudos da relação estrutura-atividade, no sentido de antecipar as propriedades físico-químicas dos novos compostos planejados (*Halle et al., 1991; Jacobi et al., 1995*).

## I.2. RELAÇÃO ESTRUTURA E ATIVIDADE CITOTÓXICA

Considerando a ação biológica, os fármacos podem ser divididos em estruturalmente inespecíficos e estruturalmente específicos. Os primeiros são aqueles em que a ação biológica não está associada diretamente à estrutura química, mas sim às suas propriedades físico-químicas, responsáveis pelo efeito farmacológico que eles produzem. Já os fármacos estruturalmente específicos, os quais procuraremos relatar com maiores detalhes, são aqueles cuja ação biológica decorre essencialmente de sua estrutura química que deve adaptar-se à estrutura tridimensional dos receptores existentes nas células, formando um complexo com eles. É evidente, portanto, que nesses fármacos a forma, o tamanho, a disposição estereoquímica da molécula e a distribuição dos grupos funcionais deverão desempenhar papel decisivo para a reatividade química.

Vários motivos levam a crer que o efeito farmacológico produzido por estas drogas deva-se à sua complexação com uma pequeníssima área quimicamente reativa de certas células do organismo, cuja topografia e grupos funcionais são ou se tornam complementares aos desses fármacos. É geralmente aceito que o receptor consiste em uma entidade tridimensional elástica constituída na maioria dos casos, de aminoácidos integrantes das proteínas. Deve apresentar uma estrutura estereoquímica não raro complementar à do fármaco e que, às vezes, após sofrer alteração conformacional, é capaz de com ele interagir, via de regra na sua conformação preferida, para formar um complexo unido por diferentes tipos de forças de ligação. Em resultado, esta complexação fármaco-receptor gera

um estímulo ou uma cadeia de estímulos que, por sua vez, causa uma ação ou efeito biológico.

É extensa a gama de fármacos que atuam como quimioterápicos, tais como: antibióticos, fungicidas, antivirais, antimaláricos, tripanomicidas, esquistossomicidas e antineoplásicos.

Um grande número de quimioterápicos atua a nível de supressão da expressão gênica principalmente como :

- a) inibidores da biossíntese de ácidos nucleicos
- b) inibidores da síntese protéica.

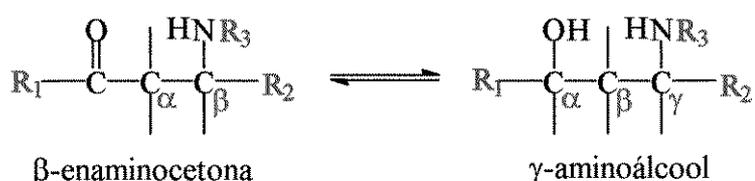
A lesão ao material genético tem sido usualmente chamada de genotoxicidade e é definida como uma indução de danos no DNA que podem ser causados pelas drogas, através de ligação covalente com a molécula do DNA, alterando-se a estrutura e/ou número de genes e cromossomos (*Groth et al., 1995*). Diversos agentes quimioterápicos complexam-se por intercalação entre pares de base do DNA (*Korolkovas & Burckhalter, 1982*).

A análise das relações entre estrutura-atividade (*SARs*) tem sido sustentada por *Barratt (1995)*, com base na premissa de que as propriedades das substâncias químicas estão implícitas na sua estrutura molecular. Segue-se então que o mecanismo de atividade de um grupo de substâncias químicas pode ser elucidado e os parâmetros relevantes medidos ou calculados, estabelecendo-se assim o princípio da relação estrutura-atividade.

As indústrias farmacêuticas usam tecnologias *in vitro* principalmente para a avaliação do metabolismo de drogas e para determinar as relações estrutura-atividade, visando a seleção de fármacos com maior atividade específica e menor citotoxicidade (*Silber & Ruegg, 1992*).

### I.3. DERIVADOS DE $\beta$ -ENAMINOCETONAS

As  $\beta$ -enaminocetonas ou bases de Mannich, tem despertado um grande interesse científico na atualidade por apresentarem atividades biológicas diversas e por servirem como intermediários para a síntese de  $\gamma$ -aminoálcoois e compostos heterocíclicos (*Gevorgyan et al., 1984*), de grande aplicabilidade como fármacos. Geralmente, os  $\gamma$ -aminoálcoois são obtidos pela redução de  $\beta$ -enaminocetonas, conforme o esquema abaixo:



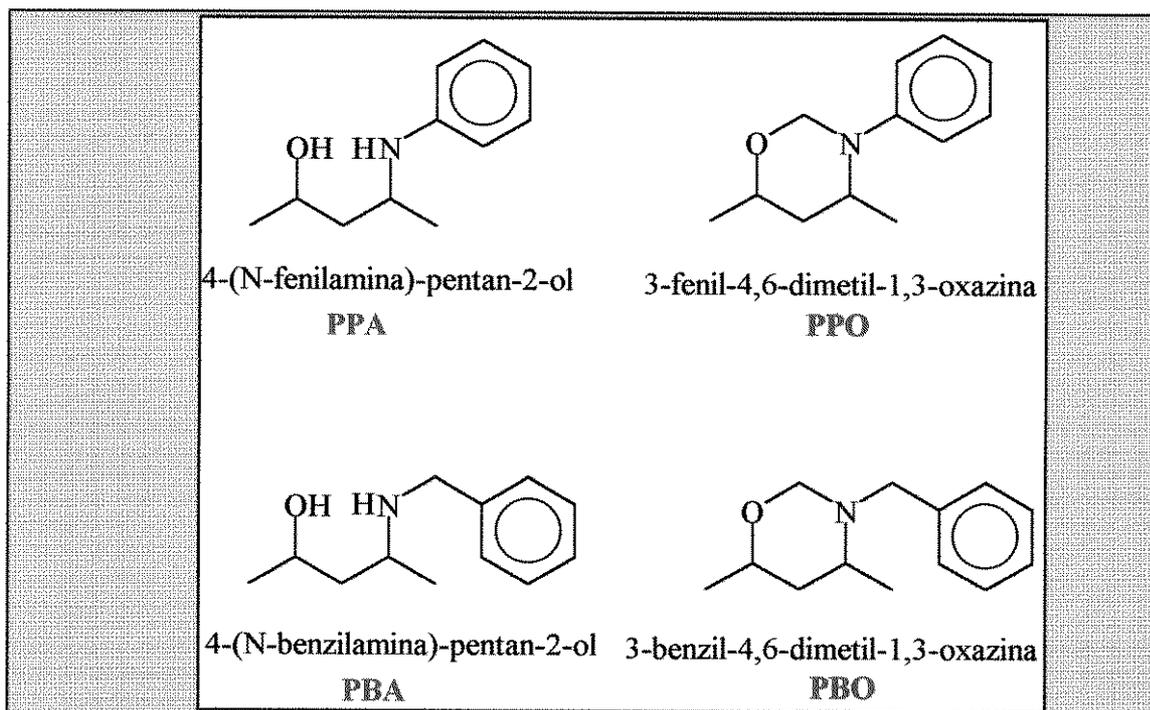
Estruturas de aminocetonas e aminoálcoois tem sido associadas com atividades farmacológicas diversas, como ação antiinflamatória, antitumoral, analgésica, psicotrópica, espasmolítica, musculotrópica, neurotrópica (*Grizard et al., 1973; Gevorgyan et al., 1984; Bostwick et al., 1992 e 1993*).

A importância na obtenção de  $\gamma$ -aminoálcoois com controle estereosseletivo deve-se principalmente a seu potencial farmacológico, pois sabe-se que muitos centros receptores são estereosseletivos a drogas. Isômeros óticos podem apresentar ação farmacológica diferenciada, como observado por *Lin et al. (1993)*, durante seus estudos sobre agentes serotoninérgicos.

Recentemente, uma série de  $\gamma$ -aminoálcoois foi sintetizada a partir das  $\beta$ -enaminocetonas correspondentes, os quais foram quimicamente caracterizados. Os  $\gamma$ -aminoálcoois foram obtidos pela redução das  $\beta$ -enaminocetonas com boroidreto de sódio, utilizando-se como solvente o ácido acético. Este processo, inédito até então, resultou em bons rendimentos (70 a 98%), com excessos diastereoméricos, observando-se a formação preferencial do isômero syn (75 a 95%) (*Harris & Braga, 1991a e 1991b; Harris, 1994*) (compostos em processo de registro de patente).

Os  $\gamma$ -aminoálcoois foram convertidos aos derivados cíclicos oxazínicos pela condensação com formaldeído em éter etílico, obtendo-se em todos os casos conversão quantitativa do  $\gamma$ -aminoálcool à tetra-hidro-1,3-oxazina correspondente (*Harris, 1994*).

A **Figura 1** apresenta as estruturas dos  $\gamma$ -aminoálcoois e derivados cíclicos oxazínicos aqui estudados.



**FIGURA 1. ESTRUTURA DOS  $\gamma$ -AMINOÁLCOOIS E SEUS DERIVADOS OXAZÍNICOS**

A potencial aplicação farmacológica dos  $\gamma$ -aminoálcoois , e sua obtenção seletiva com alto rendimento despertou o nosso interesse pelo estudo da citotoxicidade de alguns destes compostos. Também motivou o nosso interesse o fato destes compostos serem recém sintetizados e ainda não explorados na literatura.

## **II. OBJETIVOS**

## Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho constitui no desenvolvimento e padronização de ensaios *in vitro* para a avaliação da toxicidade de novos compostos de interesse biológico em culturas de células de mamíferos.

## Objetivos Específicos

1. Padronização de técnicas para a avaliação de citotoxicidade em fibroblastos V79, utilizando-se agentes tóxicos conhecidos como o *Triton X-100*, *Butanol-1*, *Álcool alílico* e *Heptanol-1*.

Para isso, foram selecionadas técnicas *in vitro* amplamente usadas e baseadas em diferentes alvos críticos.

2. Análise da citotoxicidade de novos compostos de interesse farmacológico, estruturalmente relacionados. Foram selecionados para esses estudos quatro novos compostos sintéticos obtidos por *Harris & Braga (1991 a e b)*, a saber:

Os  $\gamma$ -aminoálcoois:

**PBA** : 4-(N-benzilamina)-pentan-2-ol, ou pentanolbenzilamina

**PPA** : 4-(N-fenilamina)-pentan-2-ol, ou pentanolfenilamina e

Os derivados oxazínicos:

**PBO**: 3-benzil-4,6-dimetil-1,3-oxazina, a oxazina derivada do PBA

**PPO**: 3-fenil-4,6-dimetil-1,3-oxazina, a oxazina derivada do PPA

Além do interesse farmacológico dos  $\gamma$ -aminoálcoois e derivados, em geral, os quatro compostos particularmente selecionados para nossos estudos apresentaram algumas características estruturais interessantes, como:

- a) grupos hidrofílicos, o que permite sua solubilização em meio de cultura;
- b) grupos hidrofóbicos, o que possibilita sua penetração através das membranas celulares;
- c) correlação estrutural, o que os torna interessantes para futuros estudos de estrutura-atividade.

3. Análise da relação estrutura e atividade citotóxica de derivados de  $\beta$ -enaminocetonas selecionadas.

Interessou-nos ainda analisar a influência do radical benzil, comparativamente ao fenil, como substituintes do grupamento amino dos  $\gamma$ -aminoálcoois **PBA** e **PPA**, respectivamente. A seleção dos compostos acima teve como enfoque principal a possibilidade de analisar o efeito da ciclização molecular dos  $\gamma$ -aminoálcoois (formando derivados heterocíclicos) em suas atividades citotóxicas.

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

### III.1. REAGENTES

Os reagentes utilizados possuem grau de pureza analítico (P.A.).

a) Reagentes obtidos da **SIGMA Chemical Co., St. Louis, EUA.**

Ácido pirúvico

Desidrogenase láctica (LDH)

Sal dissódico de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA)

Fosfato dibásico de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

Triton X-100

Vermelho Neutro , Neutral Red (NR): 2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina

b) Reagentes obtidos da **Merck, R.J., Brasil.**

Ácido clorídrico (HCl)

Ácido acético glacial

Álcool etílico

Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

Formaldeído

Cloreto de potássio (KCl)

Toluol

c) Reagentes da **Reagen**

Cloreto de sódio (NaCl)

Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )

Hidróxido de sódio (NaOH)

d) Reagentes da **Synth, Brasil.**

Acetona

Ácido tricloroacético (TCA)

e) Reagentes **Aldrich, Milwaukee, EUA.**

Dimetilsulfóxido (DMSO), grau espectroscópico

f) Reagentes **Carlo Erba, Milão, Itália.**

Fosfato dibásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

g) Reagentes da **Oriental, Yeast Co. Ltd., Japão.**

Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH)

Os demais reagentes foram obtidos através das seguintes firmas:

*DMEM*, "meio de Eagle modificado por Dulbecco", adquirido da **Flow Laboratories**; *SFB*, soro fetal bovino, da **Cultilab** ou da **Nutricel**; *Tripsina*, (1:250), da **BBL e Difco**; *Solução de Penicilina e estreptomicina*, da **Laborclin**; *Timidina tritiada (<sup>3</sup>H-Tdr)*, 82,2 Ci/mmol; os componentes do líquido de cintilação : *PPO (2,5-difenil oxazol)* e *POPOP [p-bis/2-(5-fenil oxazoil/-benzeno)]*, da **New England Nuclear**, ou da **Du Pont** e *CO<sub>2</sub>*, da **White Martins S.A.**

### III.2. SOLUÇÕES ESPECIAIS

**Meio de Cultura, DMEM:** Meio de Eagle modificado por Dulbecco, onde 13,45 g da mistura comercial (pó), foram dissolvidos em volume adequado de água desionizada (1 litro), ao qual foram adicionados 1,2g/L de NaHCO<sub>3</sub> e a solução de antibióticos, 20ml/L [penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100µg/ml)]. Os meios de cultura preparados foram esterilizados por filtração em membrana Millipore com diâmetro de poro 0,22 µm e guardados em geladeira até a utilização. A adição do SFB foi

realizada 48 horas antes da utilização e os meios foram incubados a 37°C durante este período, para verificar ausência de contaminações.

**Tampão Salina Fosfato, PBS-A:** NaCl, 137mM; KCl, 26,8mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,1mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,47mM; pH 7,2-7,4. **PBS-Ca<sup>2+</sup> = PBS-A + CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O (1mM).**

**Tripsina:** a solução de tripsina foi preparada em PBS-A, numa concentração de 0,1% (m/v), contendo 1mM de EDTA. Estas soluções, foram esterilizadas por filtração e armazenadas em freezer até o momento da utilização.

**Coquetel de Cintilação PPO/POPOP:** sendo 4,0g PPO e 0,1g POPOP, dissolvidos em 1L de toluol.

### III.3. CULTURA DE CÉLULAS

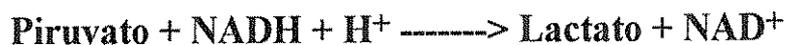
A linhagem celular V79, clone M8, originada de fibroblastos de pulmão de hamster chinês, foi obtida através do Laboratório de Prof. Dr. Rogério Meneghini, I.Q.,USP e cultivada em placas de Petri (diâmetro: 10 cm), em DMEM + SFB (10%). As células cresceram em monocamadas, aderidas ao fundo da placa de cultura, mantidas a 37°C em atmosfera úmida com CO<sub>2</sub> (5%).

A manutenção da linhagem foi realizada através de repiques periódicos. Assim sendo, as placas foram lavadas em tampão PBS e as

células descoladas do fundo das placas com 2 ml de solução de tripsina, obtendo-se assim uma suspensão celular de onde alíquotas foram transferidas para outras placas de cultura contendo meio fresco.

#### III.4. MEDIDA DA LIBERAÇÃO DA ENZIMA DESIDROGENASE LÁTICA (LDH) POR CÉLULAS V79

A liberação da LDH foi medida espectrofotometricamente, acompanhando-se a catálise da redução de piruvato a lactato (reação abaixo), através da medida do desaparecimento de NADH segundo *Mitchell et al. (1980)*. O consumo de NADH foi acompanhado pela sua absorção específica a 340 nm, em intervalos de 30 s durante 3 min.



Foram inoculadas  $3,0 \times 10^4$  células V79/pocinho (placas com 24 pocinhos) e cultivadas por 44h, a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. Ao final deste período as células foram lavadas com PBS-A, adicionando-se logo a seguir meio fresco (sem SFB) contendo várias concentrações dos agentes testes (1 ml/pocinho). Após 2h de incubação a 37°C, o meio foi coletado em tubos plásticos com tampa (1,8ml) e mantido em gelo. Estes foram centrifugados a 1.500g, 5°C por 5 min.

A reação catalisada pela LDH foi realizada em cubetas descartáveis (2,5 ml), pela adição de alíquotas de 80 µl do meio de tratamento, com volume final de 2,5 ml, em tampão fosfato [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,18 g/L) + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

(22,47 g/L)] 0,1M , pH 7,2-7,4, contendo NADH (2,5 mg/ml) e piruvato de sódio (1 mg/ml). A reação foi acompanhada em espectrofotômetro DW-2000, SLM-Aminco, num comprimento de onda de 340nm por 3 minutos, a 37°C, em intervalos de 30 segundos.

*Cálculos*, de acordo com *Henry et al., 1960*.

a) O cálculo da variação média da  $A_{340}/\text{min}$ , foi feito subtraindo-se os valores de:

- 1)  $A_1$ : A (30s) - A (90s);
- 2)  $A_2$ : A (60s) - A (120s);
- 3)  $A_3$ : A (90s) - A (150s) e
- 4)  $A_4$ : A (120s) - A (180s)

b) Determinando-se a média  $M_A [(A_1+A_2+A_3+A_4): 4]$  entre eles.

c) A atividade da LDH foi então determinada pela fórmula:

$$\text{LDH (Unidades/ml)} = M_A (\text{abs}) \times D \times F, \text{ onde}$$

D = fator de diluição = 10 000

F = fator de temperatura = 1,16 ; a 30°C

### III.5. MEDIDA DA INIBIÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A taxa de proliferação dos fibroblastos V79 foi medida pelo aumento da população celular em um período de 24h, durante a fase exponencial de crescimento, que se seguiu ao tratamento com os agentes teste, de acordo com a técnica padronizada em nosso laboratório (*Souza-Pinto et al., 1996; Souza-Pinto, 1997*).

Foram semeados fibroblastos V79 ( $3,0 \times 10^4$ )/pocinho, em placas de 24 pocinhos, diâmetro (16 mm). O cultivo foi realizado por 44h, a 37°C, em incubadora de CO<sub>2</sub> (5%). Após este período as células foram lavadas com PBS-A e expostas às soluções teste (1 ml/pocinho, em DMEM sem SFB, durante 2h, a 37°C). Findo o tratamento, as células foram lavadas com tampão e cultivadas novamente em meio completo, nas mesmas condições anteriores por 24h. Ao final, as células foram lavadas com tampão PBS-Ca<sup>2+</sup> gelado, fixadas em TCA 5% e lisadas em 1 ml de NaOH (0.5 N). A massa celular foi estimada através da leitura da absorbância dos lisados a 260 nm. Este parâmetro é um indicador da população celular, uma vez que a relação entre os valores de A<sub>260</sub> e o número de células em um lisado descrevem uma função linear (*Gesztes, 1990*).

A proliferação relativa da população celular no período de 24h, foi calculada em função da diferença entre os valores de absorbância dos lisados celulares ao início e ao final do período de crescimento. A variação obtida para as células controle foi considerada 100% de proliferação no período. A proliferação relativa das células tratadas foi expressa como o percentual de proliferação em relação às células controle.

### III.6. MEDIDA DA CAPTAÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO

Esta metodologia é baseada na habilidade das células viáveis em incorporarem o corante *vermelho neutro* ("Neutral Red", *NR*), nos lisossomos. O ensaio, segundo *Borenfreund & Puerner (1984)*, consiste na determinação da perda da viabilidade celular pela medida da inibição da captação do vermelho neutro.

Células V79 ( $3,0 \times 10^4$  /pocinho) foram incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  por 44 hs e então expostas aos agentes teste por 2h, a  $37^\circ\text{C}$ . Após o tratamento o meio foi renovado por meio fresco, contendo o corante Vermelho Neutro ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). A solução estoque do corante (0,4% m/v) foi preparada em água desionizada e incubada por 24 hs, a  $37^\circ\text{C}$ , protegida da luz e posteriormente centrifugada (1.500g), antes da sua utilização.

As culturas foram incubadas por 3h, para que se permitisse a captação do vermelho neutro, pelos lisossomos das células viáveis. Decorrido o tempo de captação, o meio foi removido e as células foram rapidamente lavadas e fixadas com solução aquosa de formol (4%) e  $\text{CaCl}_2$ (1%), gelado. O corante incorporado foi então extraído através de uma solução aquosa contendo ácido acético (1%) e etanol (50%) gelada. O corante foi quantificado em espectrofotômetro, medindo-se os valores da absorbância a 540 nm. A seguir as células foram lavadas com etanol e posteriormente lisadas com 1 ml de NaOH (0,5N), 1h, a  $37^\circ\text{C}$ . A população de células foi então determinada através da medida das absorbâncias dos lisados em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 260 nm.

### III.7. MEDIDA DA INIBIÇÃO DA TAXA DE SÍNTESE DE DNA

A quantidade de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]\text{-Tdr}$ ), incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como medida da atividade de síntese de DNA, segundo *Painter (1977)*.

Para isso, células V79 foram plaqueadas ( $3,0 \times 10^4/\text{pocinho}$ ) em placas com pocinhos e incubadas, por 44hs a  $37^\circ\text{C}$ . Em fase exponencial de crescimento, foram expostas aos agentes testes em  $\text{PBS-Ca}^{2+}$ , durante 30min a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$ . Após o tratamento, as células foram lavadas com  $\text{PBS-Ca}^{2+}$  e incubadas em meio completo, por um período de recuperação de 90 min., quando a inibição da taxa de síntese do DNA atinge valores máximos, como estabelecidos por *Painter (1977)* e confirmados em nosso laboratório por *Arévalo et al. (1996)*, *Souza-Pinto et al. (1996)* e *Souza-Pinto (1997)*. Em seguida, as células foram incubadas em meio contendo  $^3\text{H-Tdr}$  ( $5\text{mCi/ml}$ ), durante 1h para marcação do DNA. As células foram então lavadas com  $\text{PBS-Ca}^{2+}$  gelado, fixadas em ácido tricloroacético (TCA) 5% gelado por 5 minutos e lavadas em etanol gelado. Após a secagem das placas ao ar, foi realizada a lise celular com 1,0 ml de  $\text{NaOH}$ , 0.5M, durante 1 hora, a  $37^\circ\text{C}$ .

A massa celular foi estimada através da leitura da absorbância em 260 nm, em espectrofotômetro DW-2000, SLM-Aminco. Aliquotas de  $200\mu\text{l}$  de cada lisado celular foram aplicadas em papel Whatman nº17 ( $1,5 \times 1,9 \text{ cm}$ ) em duplicatas, sendo posteriormente precipitadas em TCA 5%, gelado e sequencialmente lavadas em etanol e acetona gelados. Os papéis foram secos em estufa e submetidos à contagem da radioatividade, em 5.0 ml de

coquetel de cintilação PPO-POPOP, no contador de cintilação Beckmann LS 6000.

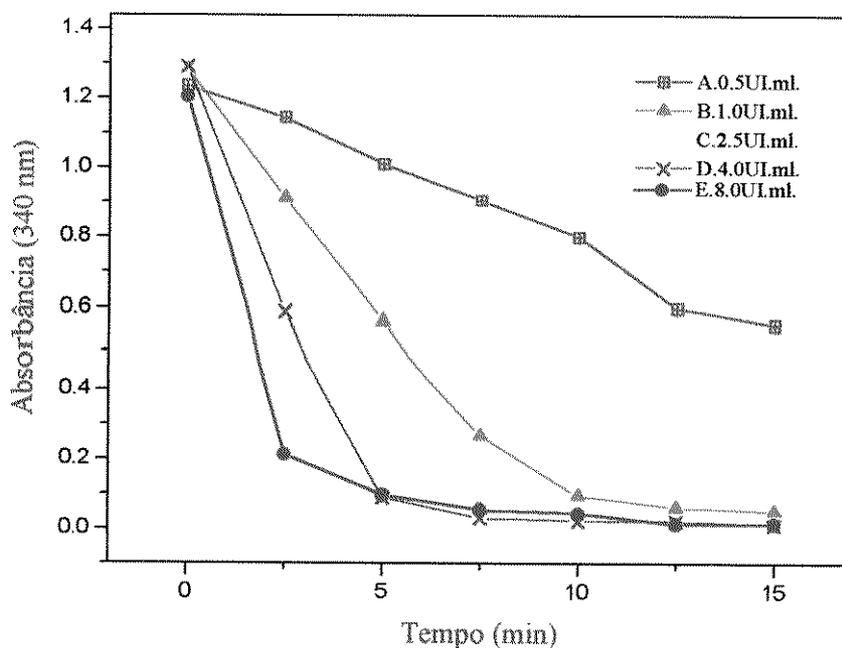
A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da **taxa de síntese do DNA** (CPM/ $A_{260}$ ). Os dados foram expressos em porcentagem da síntese do DNA nas células controle (100%), expostas somente ao tampão.

## **IV. RESULTADOS**

#### IV.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH) POR FIBROBLASTOS V 79

A liberação de enzimas citoplasmáticas no meio de cultura reflete a perda da integridade da membrana celular, o primeiro alvo da ação de uma substância citotóxica. Assim, a atividade de LDH no meio extracelular constitui um indicador largamente utilizado para expressão da citotoxicidade (*Mitchell et al., 1980; Fautrel et al., 1991; Silber & Ruegg, 1992; Loprieno et al., 1994; Groth et al., 1995; Clemenson et al., 1996*).

Essa técnica foi padronizada em nosso laboratório de acordo com o protocolo de *Mitchell et al. (1980)*, e foi realizada em duas etapas. Primeiramente, buscamos estabelecer as condições do ensaio para a medida da atividade enzimática, utilizando enzima purificada e obtendo-se desta forma a curva-padrão da atividade da LDH. Posteriormente, procuramos detectar a atividade da enzima no meio de cultivo de células V79, tratadas com agentes químicos diferentes. A atividade da enzima foi determinada acompanhando-se o consumo do cofator da reação, NADH, como descrito em Métodos. A **Figura 2** apresenta as cinéticas de consumo em NADH por diferentes atividades da enzima. A curva mostra que a velocidade da reação aumenta gradativamente com o aumento da atividade da LDH, de 0,5 a 8,0 UI/ml. Nas concentrações de enzima mais elevadas o NADH é consumido rapidamente, sendo depletado após 5 minutos do início da reação. O intervalo de 3 minutos foi selecionado para as análises posteriores envolvendo a liberação de LDH, por estar situado na fase linear das curvas.



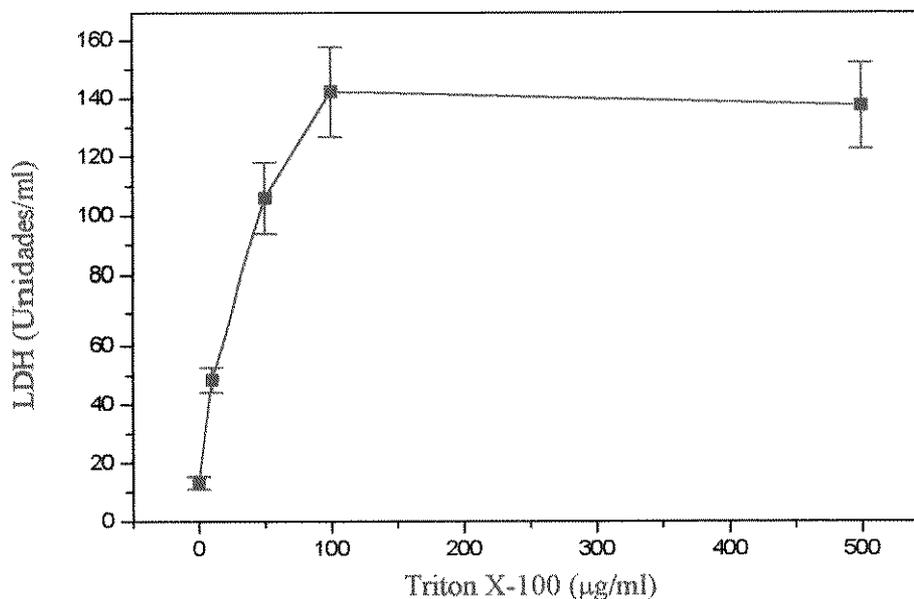
**FIGURA 2: CURVA PADRÃO DE ATIVIDADE DA LDH.**

Ensaio de 2,5 ml foram preparados em cubetas, em tampão fosfato 0,1 M; pH 7,2; contendo NADH (2,5 mg/ml) e piruvato (1,0 mg/ml). A reação foi iniciada pela adição de microvolumes da enzima para as atividades finais acima indicadas e foi acompanhada por 15 minutos, com medidas de absorbância a 340 nm a cada 30 segundos.

A figura acima representa a média de dois experimentos em duplicatas.

A utilização desta técnica para avaliação da citotoxicidade de compostos para células V79 foi padronizada com um detergente conhecido: o Triton X-100.

O Triton X-100 é um agente tensoativo, do tipo não iônico e conhecido como potente agente citotóxico (*Shopsis et al., 1985*). A **Figura 3** e **Tabela I** apresentam o efeito citotóxico do Triton X-100 para células V79, determinado pela medida da atividade de LDH no meio de tratamento das células. Verificou-se que este detergente causa liberação de LDH no meio de cultura de maneira dependente da dose, atingindo um efeito máximo na concentração de 100 µg/ml.



**FIGURA 3: ATIVIDADE DA LDH EM CÉLULAS V79  
NA PRESENÇA DE TRITON X-100**

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a diferentes concentrações de Triton X-100, dissolvido em meio de cultura sem soro fetal bovino, por 2 horas a 37<sup>0</sup>C, CO<sub>2</sub> (5%). Após o tratamento, o meio de cultura foi removido para medida da atividade de LDH. Alíquotas de 80µl foram adicionadas ao meio de reação. A reação foi acompanhada pela medida da absorbância a 340 nm, por 3 minutos, em intervalos de 30 segundos.

Os dados mostram a média de 3 experimentos em triplicatas.

**TABELA I. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE TRITON X-100 EM CÉLULAS V 79 ATRAVÉS DA LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)**

*Triton X-100* [µg/ml]                      Unidades LDH/ml

<b>0</b>	<b>13,05 +/- 2,1</b>
<b>10</b>	<b>48,35 +/- 4,2</b>
<b>50</b>	<b>105,90 +/- 12,2</b>
<b>100</b>	<b>142,10 +/- 14,7</b>
<b>500</b>	<b>137,00 +/- 14,0</b>

A seguir, procuramos determinar o efeito de alguns álcoois sobre a liberação de LDH a fim de testar a aplicabilidade desta técnica para os compostos de nosso interesse. Os álcoois tem sido utilizados como padrões importantes em estudos de citotoxicidade. O butanol-1 foi selecionado como um padrão de toxicidade moderada e o álcool alílico como padrão de toxicidade severa em ensaios *in vitro* (Shopsis et al., 1985).

A Tabela II apresenta os valores de atividade da LDH no meio de incubação das células V 79 com butanol-1 e álcool alílico, utilizando-se o Triton X-100 como controle positivo, nas mesmas condições experimentais descritas na Figura 3.

**TABELA II: CITOXICIDADE DO BUTANOL-1 E ÁLCOOL ALÍLICO EM CÉLULAS V79, ATRAVÉS DA LIBERAÇÃO DE LDH**

AGENTE TESTE	CONCENTRAÇÃO	LDH [UI/ml]
<b>A. Álcool</b>		
	[mM]	
1. Butanol-1	0	5,8 +/- 2,9
	50	0,0 +/- 0
	100	0,0 +/- 0
	200	8,7 +/- 2,9
	250	11,6 +/- 5,8
	400	8,7 +/- 2,9
	<b>2. Álcool Alílico</b>	
0	12,6 +/- 4,1	
100	0,0 +/- 0	
150	0,96 +/- 0,3	
200	0,0 +/- 0	
300	5,80 +/- 4,1	
400	7,70 +/- 3,6	
<b>B.</b>		
	[µg/ml]	
<b>Detergente</b>		
1. Triton X-100	100	106,0 +/- 21,2

\*Os dados representam valores médios de 2 experimentos em triplicatas.

Os valores obtidos mostram que, em nenhuma das concentrações de butanol e de álcool alílico testadas, houve aumento da quantidade de enzima no meio, em comparação aos controles e considerando-se que o sistema respondeu positivamente ao Triton X-100 (100  $\mu\text{g/ml}$ ), procuramos estudar outras técnicas que nos fornecessem maiores dados para se aferir os possíveis efeitos citotóxicos dos álcoois.

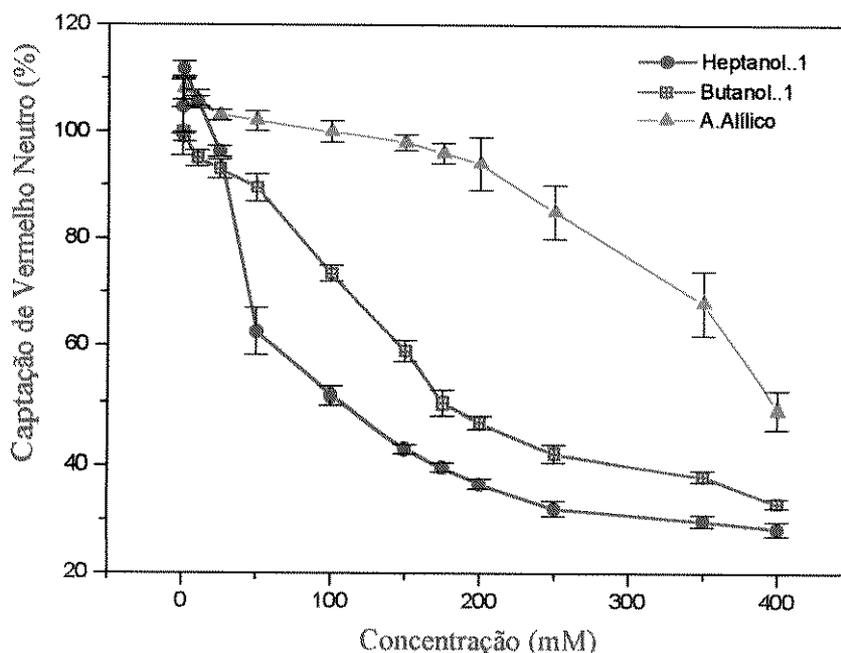
#### IV. 2. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ÁLCOOIS E DE DERIVADOS DE $\beta$ -ENAMINOCETONAS ATRAVÉS DA CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO

Outro critério utilizado para a avaliação da citotoxicidade foi a técnica de captação do corante vital vermelho neutro pelos lisossomos das células viáveis, descrito por *Borenfreund e Puerner (1984, 1985)*. Esta técnica tem sido atualmente muito utilizada para análise de citotoxicidade de toxinas diversas, como indicador da integridade da membrana celular e da atividade funcional de organelas (*Triglia et al., 1991; Babich & Borenfreund, 1992; Abdulla e Campbell, 1993; Babich et al., 1993; Repetto & Sanz, 1993; Loprieno et al., 1994; Ohno et al., 1995; Clemedson et al., 1996*).

A citotoxicidade foi avaliada pela medida da quantidade de vermelho neutro captado pelas células, detectada pela medida da absorbância no comprimento de onda de 540 nm ( $A_{540}$ ), em relação à massa celular, expressa pela absorbância medida em 260 nm ( $A_{260}$ ). Os valores expressam a captação relativa de vermelho neutro pelos lisossomos das células tratadas com álcoois em relação às placas controle, não tratadas (100%). A **Figura 4** apresenta um gráfico dose - resposta da citotoxicidade dos agentes padrões (álcoois), utilizados para estes ensaios, através da captação de vermelho neutro. Os álcoois analisados foram : butanol-1, álcool alílico e heptanol-1.

A análise da captação relativa do corante pelas células V79 expostas aos álcoois padrões mostrou um efeito de inibição de incorporação do corante em função da concentração crescente do álcool. Assim, podemos observar que a potência tóxica destes padrões segue a seguinte ordem:

**heptanol-1>butanol-1>álcool alílico**



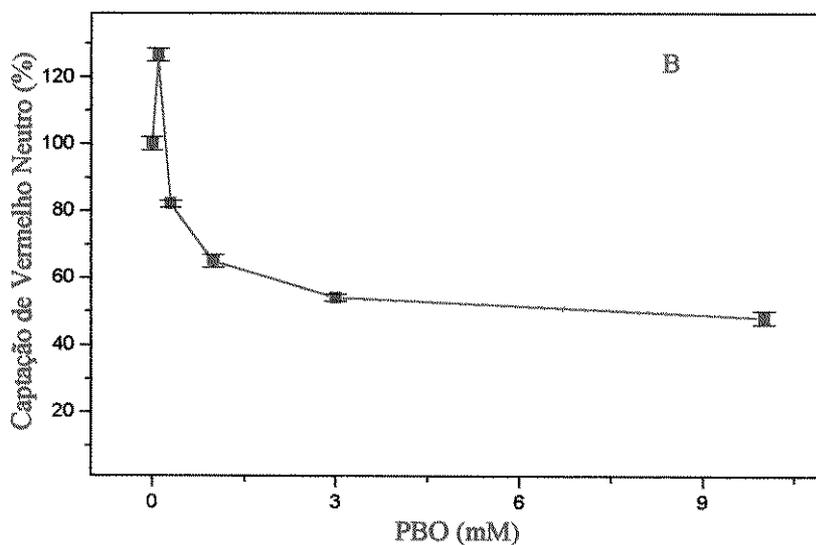
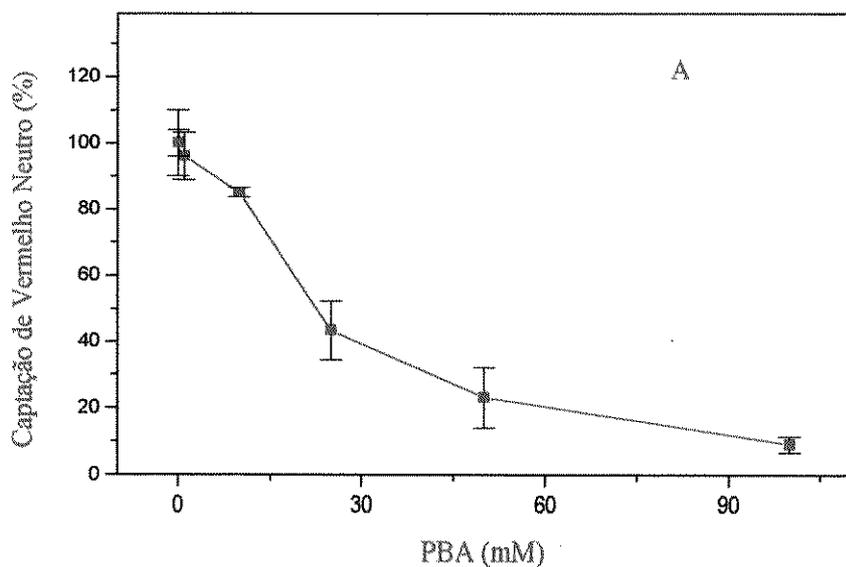
**FIGURA 4: AVALIAÇÃO DA CITOXICIDADE DE ÁLCOOIS ATRAVÉS DA CAPTAÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO**

A captação de vermelho neutro pelos lisossomos de células V79, tratadas com os álcoois **heptanol-1** ( ● ), **butanol-1** ( ■ ) e **álcool alílico**( ▲ ) foi determinada após 2 horas de tratamento em DMEM sem soro com posterior período (3 horas) de exposição ao corante. A quantidade relativa de corante captado pelas células foi expressa pela razão entre a absorbância do extrato a 540 nm e a absorbância do lisado celular a 260 nm. Os dados representam valores médios de três experimentos em triplicatas.

Ainda por este parâmetro, o  $\gamma$ -aminoálcool **PBA** (4-N-benzilamina-pentan-2-ol) e seu derivado cíclico **PBO** (3-benzil-4,6-dimetil-1,3-oxazina), foram avaliados pela captação do vermelho neutro e as curvas dose-resposta estão apresentadas na **Figura 5**.

A fim de comparar a potência de ação tóxica dos diferentes álcoois analisados, determinou-se a dose que inibe 50% da captação de vermelho neutro, denominada de **NR<sub>50</sub>**, a partir das curvas dose resposta (**Tabela III**). Os valores de **NR<sub>50</sub>** mostram que a escala de potência tóxica destes compostos segue a seguinte ordem:

**PBO>PBA>heptanol-1>butanol-1>álcool alílico**



**FIGURA 5: TOXICIDADE DE DERIVADOS DE  $\beta$ -ENAMINOCETONAS ATRAVÉS DA CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO**

A captação do corante Vermelho Neutro por células V79 em fase exponencial de crescimento foi determinada após 2 horas de exposição aos agentes teste **PBA (Painel A)** e **PBO (Painel B)**, como na **Figura 4**. Os dados representam valores médios de dois experimentos em triplicatas.

**TABELA III: TOXICIDADE DE ÁLCOOIS PADRÕES E DE DERIVADOS SINTÉTICOS DE  $\beta$ -ENAMINOCETONAS EM FIBROBLASTOS V 79**

<b>COMPOSTO</b>	<b><sup>a</sup> NR<sub>50</sub> (mM)</b>
<b>Álcool Alílico</b>	<b>350</b>
<b>1-Butanol</b>	<b>175</b>
<b>1-Heptanol</b>	<b>100</b>
<b>PBA</b>	<b>22,5</b>
<b>PBO</b>	<b>10</b>

<sup>a</sup> NR<sub>50</sub> = Concentração do composto que inibe 50% da captação de Vermelho Neutro

### IV. 3. INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS V79

A medida da taxa de inibição da proliferação celular tem sido utilizada como um indicador eficiente de citotoxicidade por outros e por nós (*Shaw, 1994; Groth et al., 1995; Jacobi et al., 1995; Arévalo et al., 1996; Souza-Pinto et al., 1996; Souza-Pinto, 1997*).

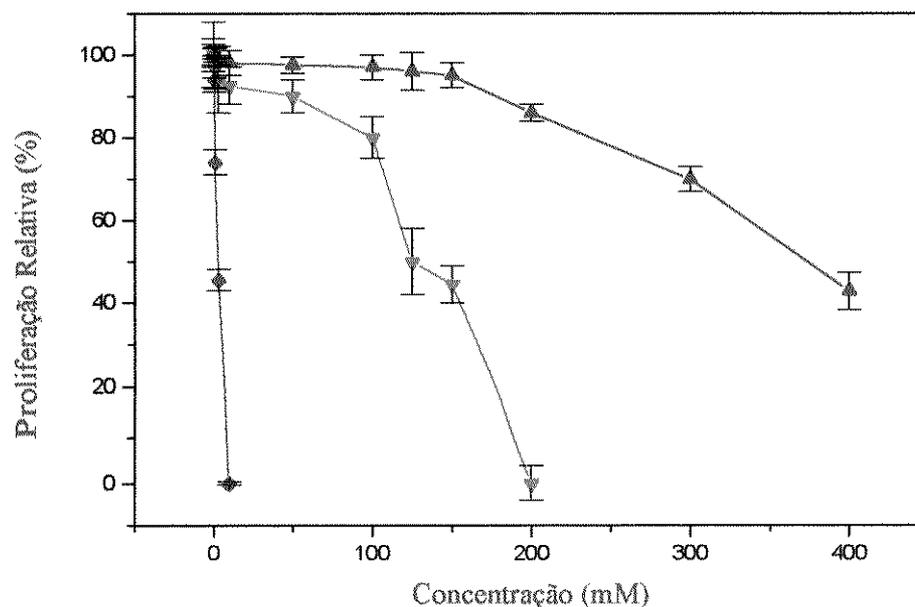
Inicialmente, analisamos a taxa da proliferação celular de fibroblastos V79 expostos a diferentes concentrações dos álcoois padrões: álcool alílico, butanol-1 e heptanol-1. O efeito inibitório dos agentes teste sobre a proliferação celular foi medido 24 horas após a exposição, como a variação da população celular neste período.

A **Tabela IV** apresenta os dados e a **Figura 6** apresenta as curvas de inibição da proliferação celular em função da concentração de butanol-1, álcool alílico e heptanol-1. Observamos que a intensidade de inibição é dependente da concentração dos compostos. Entretanto a faixa de concentração tóxica do heptanol-1 é bem menor que as apresentadas pelos outros dois álcoois.

**TABELA IV. CITOTOXICIDADE DOS ÁLCOOIS PADRÕES PELA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS V79**

Concentração (µM)	Deposição (PR (%))	Etanol (PR (%))	Et. Anilol (PR (%))
0	100+/-8	100+/-4	100+/-2,5
0,3	94+/-3	98+/-3,5	99,6+/-0,4
1	74+/-3	96,8+/-5	99+/-0,7
3	45,5+/-2,5	94+/-8	98,5+/-0,9
10	0+/-0,4	92,5+/-4,5	98+/-2,8
50	0+/-0	90+/-4	97,5+/-2
100	0+/-0	80+/-5	97+/-3,2
125	0+/-0	50+/-8	96+/-2
150	0+/-0	44,5+/-4,5	95,3+/-3,3
200	0+/-0	0+/-4	86+/-2
300	0+/-0	0+/-0	70+/-3,1
400	0+/-0	0+/-0	43+/-4,5

**\*PR:** Proliferação Relativa (percentuaes da variação da  $A_{260}$  em relação aos controles. Os dados representam valores médios de 3 experimentos em triplicatas com os respectivos desvios da média).



**FIGURA 6: CITOTOXICIDADE DE ÁLCOOIS PADRÕES DETERMINADOS PELA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE CÉLULAS V79**

Inibição da taxa de proliferação de células V79 por butanol-1 (▼), álcool alílico (▲) e heptanol-1 (◆). Células V79 em fase exponencial de crescimento foram incubadas por 2 horas a 37°C, com diferentes concentrações dos álcoois padrões dissolvidos em DMEM sem soro. Ao final do tratamento as células foram reincubadas em DMEM + SFB(10%) por 24 horas e em seguida fixadas e lisadas em NaOH 0,5M para medida da  $A_{260}$  dos lisados. A proliferação relativa foi expressa como percentuaes da variação da  $A_{260}$  em relação às placas controle. O gráfico representa valores médios de 3 ensaios em triplicatas com os respectivos desvios da média.

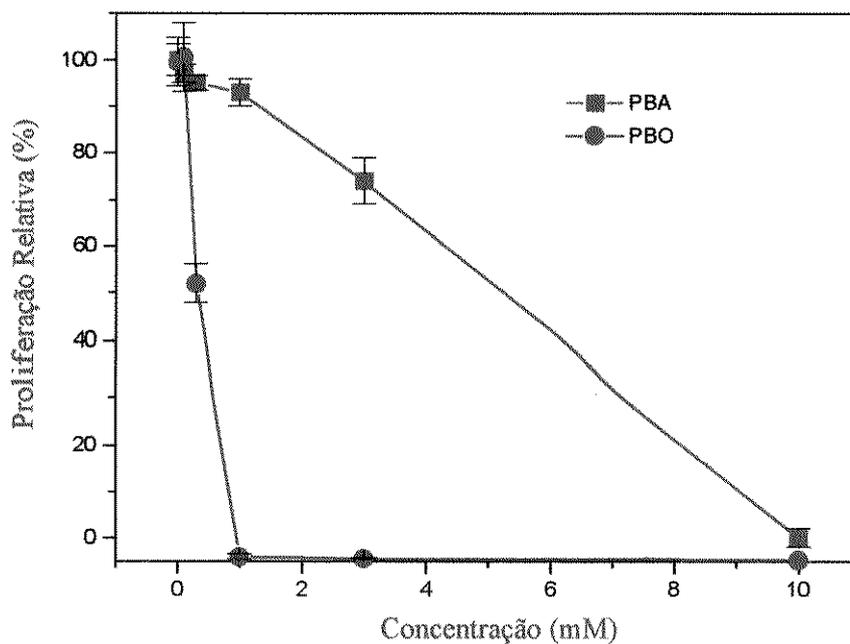
A avaliação da citotoxicidade dos novos compostos sintéticos, os  $\gamma$ -aminoálcoois **PBA** e **PPA** e seus respectivos derivados oxazínicos, **PBO** e **PPO** estão apresentados na **Tabela V** e nas **Figuras 7 e 8**.

Encontramos na **Figura 7** a curva dose-resposta, onde foi analisada a citotoxicidade do **PBA** e do seu derivado oxazínico **PBO** através da inibição do crescimento celular e na **Figura 8** as curvas obtidas para os outros dois compostos **PPA** e seu derivado oxazínico **PPO**. As figuras mostram que a faixa de concentração efetiva das oxazinas é menor que a dos  $\gamma$ -aminoálcoois correspondentes.

**TABELA V. INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR INDUZIDA PELOS DERIVADOS DE  $\beta$ -ENAMINOCETONAS EM CÉLULAS V79**

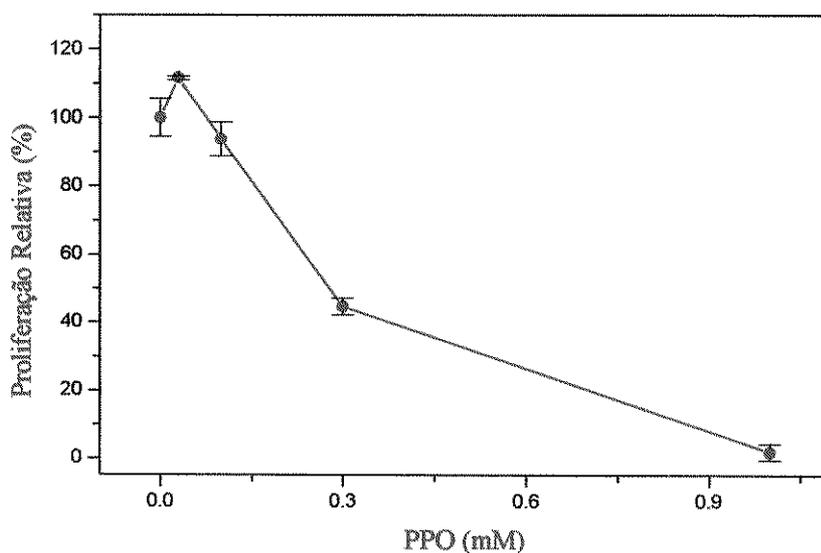
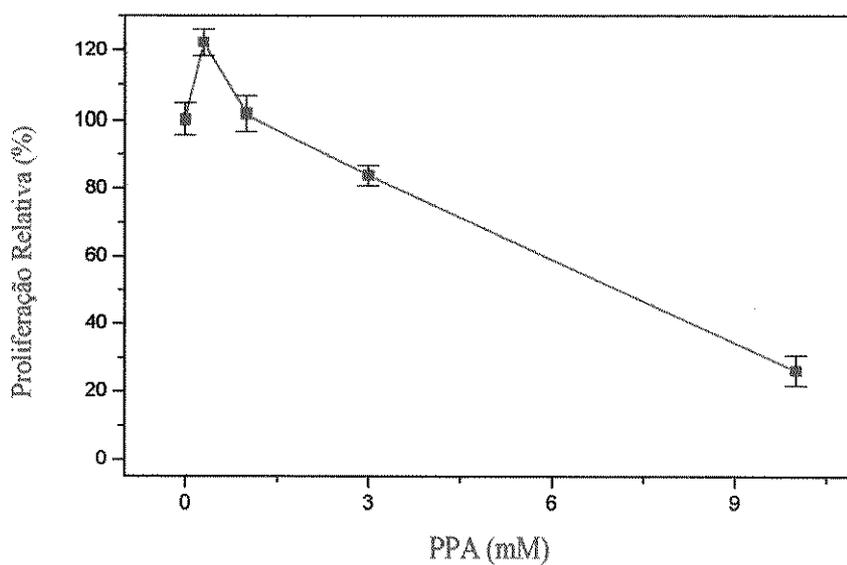
Concentração (µM)	PBA-PR(%)	PBO-PR(%)	PPA-PR(%)	PPO-PR(%)
0	100+/-3,5	100+/-3,5	100+/-5,5	100+/-5,5
0,03	98,2+/-3	101+/-4	122+3,9	111,5+/-0,6
0,1	97+/-2	100,5+/-7	101,5+/-5	93,7+/-5
0,3	95+/-1,5	54,5+/-4	100+/-5	44,5+/-2,5
1	93+/-3	0,9+/-0,5	99+/-6	1,8+/-2
3	74+/-5	0,6+/-0,1	83,6+/-3	0+/-0
10	0+/-2	0,2+/-0	26,1+/-4,5	0+/-0

\***PR: Proliferação Relativa** (Percentuaes da variação da  $A_{260}$  em relação aos controles. Os dados representam valores médios de 2 experimentos em triplicatas com os respectivos desvios da média).



**FIGURA 7: INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELO  $\gamma$ -AMINOÁLCOOL PBA ( ■ ) E SEU DERIVADO OXAZÍNICO PBO ( ● )**

As curvas dose-resposta de inibição da proliferação de células V79 após 2 horas de exposição aos agentes teste, foram determinadas medindo-se a população celular 24 horas após o tratamento, como descrito na **Figura 6**. Os dados representam valores médios de dois experimentos em triplicatas.



**FIGURA 8: INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELO  $\gamma$ -AMINOÁLCOOL PPA (■) E SEU DERIVADO OXAZÍNICO PPO (●)**

A citotoxicidade dos compostos acima foram determinadas através da inibição da proliferação celular como descrito na **Figura 6**. Os dados representam valores médios de dois experimentos em triplicatas.

A Tabela VI apresenta a toxicidade comparativa em fibroblastos V79, dos álcoois padrões e dos novos compostos de interesse, através dos seus valores de  $ID_{50}$  (dose do composto que inibe 50% da proliferação celular), determinados a partir das respectivas curvas dose-resposta.

**TABELA VI : TOXICIDADE DE ÁLCOOIS E DERIVADOS DE  $\beta$ -ENAMINOCETONAS EM FIBROBLASTOS V 79**

COMPOSTO	$^aID_{50}(mM)$
Álcool Alílico	370
Butanol-1	135
PPA	6,4
PBA	5,4
Heptanol-1	2,8
PBO	0,33
PPO	0,28

$^aID_{50}(mM)$ =Dose do composto que inibe 50% da proliferação celular

Comparando-se as concentrações que induzem 50% de inibição da proliferação em fibroblastos V 79, podemos estabelecer uma escala de potência para os compostos analisados:

**PPO>PBO>1-heptanol>PBA>PPA>1-butanol>Álcool Alílico**

#### IV.4. INIBIÇÃO DA TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V 79

Os efeitos inibitórios sobre a proliferação celular apresentados pelos derivados de  $\beta$ -enaminocetonas conduziram-nos a avaliar também seus efeitos sobre a de síntese do DNA, para verificar se as alterações no crescimento de células V79 estariam relacionadas com a inibição da replicação do DNA.

A inibição da síntese de DNA foi detectada pela incorporação de [ $^3$ H]-timidina no DNA das células em fase exponencial de crescimento, após exposição a diferentes concentrações dos derivados de  $\beta$ -enaminocetonas, **PBA**, **PBO**, **PPA** e **PPO**. As taxas de síntese de DNA foram medidas 90 minutos após o tratamento, quando se detectam os maiores níveis de inibição da síntese por agentes que lesam diretamente o DNA (*Painter, 1977*).

A Tabela VII apresenta os dados referentes às Figuras 9 e 10.

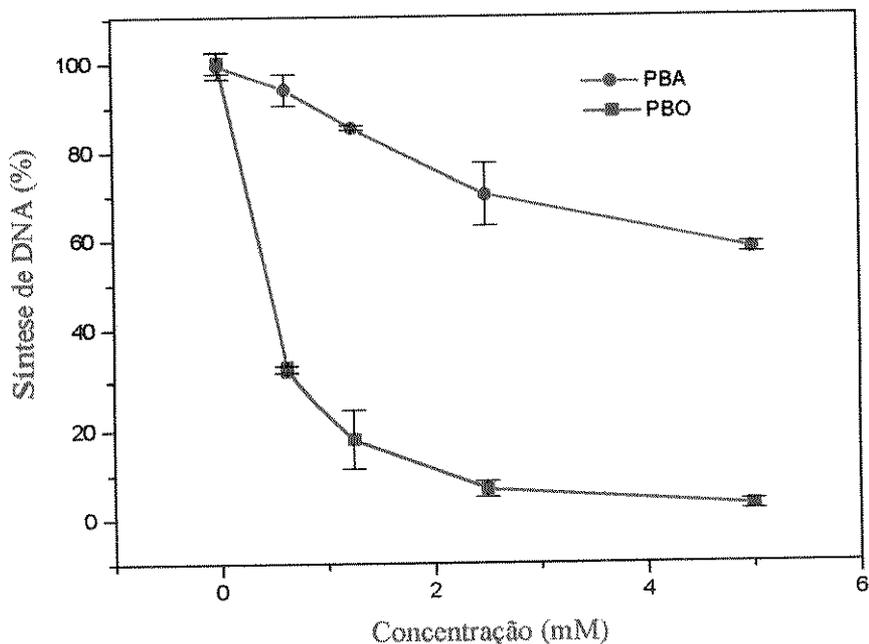
A Figura 9 apresenta as curvas dose-resposta obtidas pela exposição de células V79 às concentrações crescentes de **PBA** e **PBO**. A figura mostra que o  $\gamma$ -aminoálcool **PBA** causa uma inibição limitada da taxa de síntese do DNA em células V79 (máximo de 35%) na faixa de concentração entre 0,5 e 5,0 mM, enquanto a oxazina correspondente induz um forte efeito inibitório sobre a síntese de DNA, na mesma faixa de concentração.

Na **Figura 10** podemos observar que o  $\gamma$ -aminoálcool **PPA** não apresenta efeito inibitório significativo sobre a síntese de DNA em células V79, na faixa de concentração entre 0,5 e 5,0mM, enquanto que o seu derivado oxazínico, **PPO**, apresenta uma inibição potente nesta mesma faixa de concentração.

**TABELA VII. INIBIÇÃO DA TAXA DE SÍNTESE DE DNA PELOS  $\gamma$ -AMINOÁLCOOS E SEUS DERIVADOS OXAZÍNICOS EM FIBROBLASTOS V79**

Concentração (mM)	PPA S.DNA (%)	PPO S.DNA (%)	PPA S.DNA (%)	PPO S.DNA (%)
0	100+/-2,6	100+/-2,6	100+/-5,4	100+/-5,4
0,625	94,9+/-3,2	31,9+/-0,5	97,8+/-3,1	47,4+/-3
1,25	87+/-0,5	17,8+/-6,5	96,5+/-2,5	26,7+/-0,3
2,5	73,3+/-6,5	6,7+/-1,8	92,3+/-3,1	12,5+/-2,5
5,0	62,1+/-1,1	2,9+/-1,1	91,3+/-3,7	6,3+/-1,2

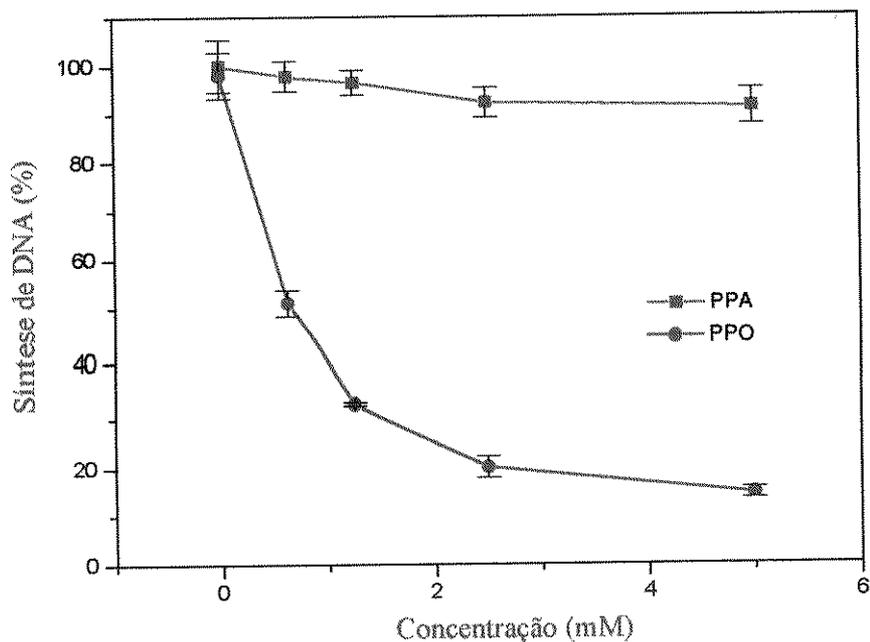
\***S.DNA(%)**: Síntese de DNA (CPM/A<sub>260</sub>) (%), onde os dados representam a média de 3 experimentos em triplicatas, com os respectivos desvios da média.



**FIGURA 9: INIBIÇÃO DA TAXA DE SÍNTESE DE DNA PELO  $\gamma$ -AMINOÁLCOOL PBA E SEU DERIVADO OXAZÍNICO PBO**

Células V79 foram semeadas ( $3,0 \times 10^4$  cel/pocinho) e incubadas por 44hs, como descrito em Materiais e Métodos. A seguir as culturas foram expostas a diferentes concentrações de **PBA** e **PBO**, diluídas em PBS- $\text{Ca}^{2+}$ , por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após o tratamento as culturas foram incubadas por 90 minutos em DMEM+10%SFB, seguido da marcação de pulso, por 1h, com meio contendo  $[\text{H}^3]\text{-Tdr}$  (5mCi/ml). Ao final as culturas foram lisadas e a radioatividade incorporada foi medida por cintilação líquida.

Os dados mostram a média de 3 experimentos em triplicatas.



**FIGURA 10: INIBIÇÃO DA TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79, PELO  $\gamma$ -AMINOÁLCOOL PPA E SEU DERIVADO OXAZÍNICO PPO**

O tratamento das células V79 com diferentes concentrações de PPA e PPO foi realizado como descrito na legenda da **Figura 9**.

Os dados mostram a média de 3 experimentos em triplicatas.

## **V. DISCUSSÃO**

Neste trabalho realizamos estudos de citotoxicidade e de relações estrutura e atividade citotóxica utilizando metodologias *in vitro*, e usando como ferramenta básica de trabalho, células de mamífero em cultura. Os sistemas *in vitro* permitem uma rapidez maior na identificação de compostos tóxicos e podem ser utilizados para os estudos dos mecanismos de toxicidade em nível celular e subcelular (*DelRaso, 1993*).

A citotoxicidade expressa por danos celulares produzidos por agentes químicos tóxicos tem sido avaliada por diferentes critérios como: sobrevivência celular, crescimento celular, síntese de proteínas ou de DNA e viabilidade celular (*Mitchell et al., 1980; Loprieno et al., 1994; Groth et al., 1995*).

A medida da liberação de enzimas citoplasmáticas pelas células em cultura expostas aos agentes tóxicos representa um método sensível para se acessar a citotoxicidade e danos na membrana plasmática. Sendo a *LDH* uma enzima comum na maioria dos tipos de culturas celulares, a liberação de *LDH* pode ser usada como um indicador de injúria celular em todos os tipos de células em cultura (*Mitchell et al., 1980; Ohno et al., 1995; Clemedson et al., 1996*).

A *LDH* é uma enzima citosólica que é normalmente encontrada no interior das células saudáveis e nunca em seu exterior. Entretanto, quando há indução de danos celulares por agentes químicos, pode ocorrer aumento da permeabilidade da membrana celular, tornando-a mais porosa, permitindo que grandes moléculas intracelulares, como a *LDH* e outros constituintes celulares tornem-se aptos a sair do interior

das células (*Silber & Ruegg, 1992*). A *LDH*, agora extracelular é então quantificada através do consumo de NADH, medido espectrofotometricamente, refletindo os danos ocasionados pelos produtos analisados na membrana plasmática. Assim, o método utiliza um marcador bioquímico específico para avaliar danos em um alvo específico.

A avaliação da liberação de *LDH* pode ser utilizada como uma técnica *in vitro* apropriada para detectar compostos que alteram a integridade das membranas celulares, como os detergentes ou surfactantes. Tais compostos são largamente empregados em produtos de consumo diário, justificando um grande interesse nos estudos de citotoxicidade causados por estes agentes.

Em nossos estudos utilizamos o detergente Triton X-100 para padronizar a técnica de liberação de *LDH* (**Tabela I e Figura 3**). Constatamos que este agente tensoativo causou alterações na membrana celular, refletida pela liberação da *LDH*, de maneira dose-dependente. Quando as células foram tratadas com doses de Triton X-100 superiores a 100 µg/ml, a liberação de *LDH* atingiu um índice máximo, devido a lise das células. Esta técnica, entretanto, não se mostrou sensível para as análises dos álcoois padrões estudados, como relatado na **Tabela II**. Isso mostra que este método não se constitui em um indicador suficientemente sensível para a avaliação de toxinas em geral, mas sim daquelas que causam danos nas membranas celulares.

Embora a técnica de liberação de *LDH* seja recomendada para as análises de citotoxicidade em hepatócitos (*DelRaso, 1993*), para

fibroblastos V79 mostrou ser uma técnica de uso limitado. Isso nos levou a desenvolver outras técnicas que apresentassem uma resposta mais abrangente para toxinas de natureza química diferente.

A captação do vermelho neutro tem sido muito empregada como método de avaliação de citotoxicidade pela sua simplicidade, sensibilidade, reprodutibilidade e o baixo custo. Além disso, apresenta correlação positiva com alguns dados *in vivo* (*Borenfreund & Puerner, 1984; Babich et al., 1993*).

A captação relativa de vermelho neutro é um método conveniente para a detecção de alterações específicas dos lisossomos. Este corante é fracamente catiônico, difundindo-se rapidamente, através da membrana plasmática e concentrando-se nos lisossomos das células viáveis, ligando-se com os sítios aniônicos da matriz lisossomal (*Nemes e col., 1979*). Alterações da superfície celular ou da membrana lisossomal ocasionadas pela ação de xenobióticos resultam na diminuição da captação e ligação do corante, tornando possível distinguir células viáveis de células lesadas ou mortas (*Borenfreund & Puerner, 1984, 1985*).

Nos nossos trabalhos foram comparados os valores de  $NR_{50}$ , de cada composto analisado, a partir das curvas dose-resposta.

Estudos realizados com séries de álcoois demonstram a existência de correlações positivas entre os dados *in vitro* e *in vivo* (*Sewell et al., 1986 e Shopsis et al., 1987*). Verificamos que a técnica respondeu sensivelmente aos álcoois utilizados como padrões, os quais apresentaram valores de  $NR_{50}$  diferenciados. De acordo com *Shopsis &*

*Sathe, 1984*, o álcool alílico é considerado uma toxina severa *in vitro*, para o teste de captação de uridina, quando comparados os valores de  $UI_{50}$  ao teste de irritação ocular. Entretanto, em nossos ensaios, o álcool alílico comportou-se como um tóxico menos potente que o *butanol-1*, considerado um toxina moderada (*Shopsis & Sathe, 1984; Triglia et al., 1991*). Por isso, foi necessário a utilização de um outro álcool como padrão de toxicidade severa, o *heptanol-1* (*Shopsis & Sathe, 1984*). Observamos que a intensidade de inibição é dependente da concentração dos compostos. Entretanto a faixa de concentração tóxica do *heptanol-1* é bem menor que as apresentadas pelos outros dois álcoois, mostrando que este composto é uma toxina mais potente que o álcool alílico e o *butanol-1* para células V79, como demonstrado na **Tabela III**.

Apesar desta técnica ter se mostrado sensível para a determinação da citotoxicidade dos álcoois padrões analisados, ela apresenta algumas limitações para os ensaios de citotoxicidade *in vitro* (*Babich & Borenfreund, 1992*) e restrições em relação à sua aplicação para as análises citotóxicas de alguns polióis (*Olivier et al., 1995*). Por isso, analisamos através desta técnica somente o  $\gamma$ -aminoálcool **PBA** (4-N-benzilamina-pentan-2-ol) e seu derivado cíclico **PBO** (3-benzil-4,6-dimetil-1,3-oxazina), dos quais, dispúnhamos em maior quantidade.

Os nossos resultados mostram que o  $\gamma$ -aminoálcool **PBA** apresenta uma inibição na captação de vermelho neutro, em função da dose na faixa de concentração entre 10 e 100 mM, enquanto o seu derivado oxazínico, **PBO**, apresenta uma inibição na captação de vermelho neutro, em concentrações bem menores, apresentando uma resposta de saturação a partir de 3 mM.

Observamos ainda que os derivados de  $\beta$ -enaminocetonas analisados **PBA** e **PBO** (Tabela III) se comportaram como toxinas mais severas ainda que o *heptanol-1*, e que a oxazina foi duplamente mais tóxica que o  $\gamma$ -aminoálcool.

Desta forma, no intuito de buscarmos um método, que fosse realmente sensível para se aferir a toxicidade dos novos compostos sintéticos de nosso interesse, padronizamos também a técnica de inibição da proliferação celular, paralelamente aos experimentos de captação de vermelho neutro.

Os efeitos citotóxicos de compostos químicos refletem a perda da viabilidade celular, não somente através da perturbação da integridade estrutural ou metabólica das células, mas também por afetar sua capacidade reprodutiva (*Shaw, 1994; Seibert et al., 1996*). A proliferação celular pode ser quantificada por vários métodos, desde a contagem individual das células em crescimento até a quantificação do conteúdo celular.

A técnica por nós padronizada permite quantificar a massa celular pela medida dos valores da absorbância dos lisados celulares no comprimento de onda de 260 nm, que corresponde ao pico máximo de absorbância dos ácidos nucléicos.

A padronização da técnica de inibição da proliferação celular envolve a definição das condições de exposição, com o meio de incubação e tempo de exposição aos agentes teste (*Balls & Fentem, 1992; Romert et al., 1994*). Grandes períodos de incubação frente aos

compostos químicos requerem que estes sejam dissolvidos em meio contendo soro, o que não é muito recomendado, pois pode ocorrer a formação de ligações entre os xenobióticos e as proteínas do soro, subestimando-se assim, os efeitos tóxicos destes produtos. Isto também acontece quando são utilizados compostos químicos voláteis, pois sua concentração no meio de cultura acaba sendo diminuída quando o tempo de incubação é longo.

Exposições aos agentes teste por um período curto (1 a 2 hs), podem ser efetuados em meio de cultura sem soro (*Witte et al., 1995*). De acordo com *Jacobi et al. (1995)* a inibição da proliferação celular é um dos métodos mais sensíveis para se avaliar a citotoxicidade, pois permite seguir o efeito da toxina por um período subsequente ao tratamento realizado.

Em nosso laboratório esta técnica tem sido utilizada rotineiramente, para a detecção da toxicidade de diferentes compostos químicos em fibroblastos V79 (*Arévalo et al., 1996; Souza-Pinto et al., 1996; Souza-Pinto, 1997*). Neste trabalho, o crescimento celular foi quantificado como o aumento da população celular, 24 horas após ao tratamento que foi realizado em meio de cultura sem soro por 2 horas a 37°C.

Inicialmente procuramos determinar a faixa de concentração ativa para cada um dos álcoois padrões e, posteriormente, dos compostos de nosso interesse.

Os nossos resultados mostram que este método apresentou-se como o parâmetro mais sensível para se avaliar citotoxicidade de

álcoois, como mostra a comparação dos dados obtidos a nível da proliferação celular (Tabela VI) e da captação do corante *vermelho neutro* (Tabela III), no que diz respeito aos álcoois padrões analisados. Quando comparamos os valores de  $NR_{50}$  e de  $ID_{50}$  dos álcoois analisados, observamos que os valores de  $ID_{50}$  foram menores que os de  $NR_{50}$ , principalmente no caso do heptanol-1. Este álcool se mostrou como uma toxina severa, apresentando valores iguais de  $ID_{50}$  para fibroblastos V79 e para  $UI_{50}$ , quando comparados com fibroblastos 3T3 (Shopsis & Sathe, 1984).

Esses resultados indicam que a inibição da proliferação celular é o método mais sensível para as análises de citotoxicidade, dentre os aqui utilizados.

A comparação dos valores de  $ID_{50}$  (Tabela VI) mostra ainda que os derivados de  $\beta$ -enaminocetonas são potentes inibidores da proliferação celular e, portanto, tóxicos severos para células V79. Os  $\gamma$ -aminoálcoois apresentaram valores bem próximos entre si, em relação à  $ID_{50}$ , caracterizando que o  $\gamma$ -aminoálcool que contém o grupo *fenil* (PPA) foi menos tóxico que aquele contendo o grupo *benzil* (PBA). Agora, quando comparamos os  $\gamma$ -aminoálcoois com os derivados oxazínicos, notamos que em ambas as duplas a potência de ação tóxica dos derivados PBO e PPO é da ordem de 20 vezes maior em relação aos seus precursores PBA e PPA, respectivamente.

Os derivados oxazínicos PPO e PBO foram cerca de 10 vezes mais tóxicos que o *heptanol-1*, o que os caracteriza, também, como toxinas severas.

A potente ação inibitória das oxazinas sobre a proliferação celular levantou a hipótese de que esse efeito seria resultante da interferência desses compostos sobre a replicação do DNA, com conseqüente parada da divisão celular.

Para averiguar essa hipótese, analisamos os possíveis efeitos inibitórios dos derivados das  $\beta$ -enaminocetonas sobre a síntese de DNA, medindo-se inicialmente a incorporação de [ $^3$ H]-timidina no DNA das células V79. Assim como foi observado nos ensaios de proliferação celular, os derivados oxazínicos **PBO** e **PPO** apresentaram um potente efeito genotóxico em células V79, observando-se uma inibição quase total da síntese de DNA na concentração de 5 mM (**Tabela VIII**). Entretanto, nas mesmas concentrações, os  $\gamma$ -aminoálcoois correspondentes **PBA** e **PPA** mostraram um pequeno efeito inibitório sobre a taxa de síntese de DNA, sendo que neste ensaio também o derivado contendo o grupo *fenil* (**PPA**) apresentou-se com menor efeito sobre a síntese de DNA, quando comparado com o que contém o grupo *benzil* (**PBA**). Assim como ocorreu na inibição da proliferação celular, pode-se caracterizar desta forma que entre os  $\gamma$ -aminoálcoois, o **PPA** foi menos tóxico que o **PBA**.

**TABELA VIII. COMPARAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE  $\beta$ -ENAMINOCETONAS**

Agente [ ] mM	Proliferação Relativa (%)	CPM/A <sub>260</sub> (%)
0,0	100 $\pm$ 4,5	100 $\pm$ 2,6
PPA (5,0)	67,2 $\pm$ 2,5	91,3 $\pm$ 3,7
PBA (5,0)	52,8 $\pm$ 3,6	62,1 $\pm$ 1,1
PBO (5,0)	0,54 $\pm$ 0,02	2,9 $\pm$ 1,1
PPO (5,0)	0,0 $\pm$ 0,0	6,3 $\pm$ 1,2

Nossos resultados mostram ainda que ambos os derivados oxazínicos **PBO** e **PPO** apresentaram um padrão bifásico das curvas dose-resposta (**Figuras 9 e 10** respectivamente), que caracteriza os agentes que bloqueiam a replicação por induzirem lesões no DNA, e não por inibirem enzimas replicativas. Lesões no DNA tem sido observadas através de ligações covalentes de agentes químicos com o DNA, modificando sua estrutura e/ou o número de genes e ou de cromossomos. Tais influências são observadas, por exemplo, com compostos químicos eletrofilicos e hidrocarbonetos aromáticos (*Groth et al., 1995*). Independente da natureza química do agente, as lesões de DNA, conhecidamente causam uma parada temporária da replicação desta macromolécula (*Friedberg, 1985*). Segundo *Painter (1977)*, o padrão bifásico de inibição da síntese do DNA é explicado por uma

inibição da iniciação dos replicons, em baixas concentrações, e da progressão da forquilha de replicação, em altas concentrações.

Provavelmente a atividade antireplicativa dos compostos **PBO** e **PPO** está relacionada com a ciclização das moléculas, uma vez que os  $\gamma$ -aminoálcoois correspondentes não apresentaram forte ação genotóxica. Isso nos levou à uma discussão baseada nas relações estrutura-atividade biológica destes compostos.

Através das relações existentes entre as propriedades físico-químicas e as estruturas dos compostos químicos pode-se permitir antecipar as propriedades toxicológicas de determinadas substâncias químicas (*Chu, 1995*).

Trabalhos realizados por *Bair et al. (1990)*, mostram que uma nova classe de aminoálcoois, considerados compostos antitumorigênicos, agem como intercalantes do DNA. Segundo esses estudos, existe uma relação estrutura-atividade, onde a estrutura do aminoálcool está diretamente relacionada com sua capacidade de interação com o DNA, e com sua atividade antitumorigênica.

Dentre os compostos que podem se intercalar entre as fitas do DNA incluem-se compostos heterocíclicos aromáticos pertencentes a várias classes de produtos químicos, com diferentes atividades biológicas. As moléculas desses ligantes intercalam-se através de suas estruturas planares entre os pares de base da molécula do DNA (*Faddeeva & Beliaeva, 1991*). Nossos resultados sugerem que os derivados oxazínicos dos  $\gamma$ -aminoálcoois aqui estudados, **PBO** e **PPO**,

poderão se constituir como quimioterápicos antitumorais potenciais, uma vez que inibem a proliferação celular e a síntese de DNA.

Para se certificar das possíveis atividades quimioterápicas dos derivados oxazínicos **PBO** e **PPO** e confirmar a possível intercalação entre essas moléculas e o DNA, tornam-se necessários estudos adicionais, como o método de difração de raios-X. Além disso, outros critérios físico-químicos para se analisar os intercalantes de DNA, poderão ser utilizados. A inibição dos processos de replicação e transcrição do DNA, assim como a inibição de enzimas envolvidas nestes processos, representam consequências importantes da modificação da estrutura do DNA devido à intercalação (*Faddeeva & Beliaeva, 1991*).

Nossos resultados mostraram que as oxazinas derivadas dos  $\gamma$ -aminoálcoois, **PBO** e **PPO** são agentes genotóxicos potentes para fibroblastos V79, indicando que a atividade antireplicativa destes compostos está provavelmente relacionada com a ciclização das moléculas, apontando assim para o importante papel destes derivados de  $\gamma$ -aminoálcoois como prováveis intercalantes de DNA e para as suas possíveis propriedades antineoplásicas.

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

*[Consulta à ABNT-6023/89 e NBR-6023 (Abrev. Periódicos)]*

- ABDULLA, E. M. & CAMPBELL, I. C. (1993). In Vitro Tests of Neurotoxicity. *J. Pharm. Toxicol. Meth.*, **29**(2):69-75.
- ARÉVALO, A.M. (1990). Estudo da ação tóxica da tetrahydrobenzoquinona (THQ) como modelo de estresse oxidativo. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 82 p.
- ARÉVALO, A.M.; SOUZA-PINTO, N.C. DE., COSTA, A.D.T & HOFFMANN, M.E. (1996). Mechanisms of tetrahydroxy-1,4-benzoquinone toxicity to V79 cells: Involvement of free radicals produced by its autoxidation. *Cien. Cult. (São Paulo)*, **48** (1/2):103-108.
- BABICH, H. & BORENFREUND, E. (1992). Neutral red assay for toxicology in vitro. In: *In Vitro Methods of Toxicology*, Watson, R. R. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla, p. 237-251.
- BABICH, H.; STERN, A. & MUNDAY, R. (1993). In vitro cytotoxicity of 1,4-naphthoquinone derivatives to replicating cells. *Toxicol. Lett.*, **69**:69-75.
- BAIR, K.W.; TUTTLE, R.L.; KNICK, V.C. & McKEE, D.D. (1990). (1-Pyrenylmethyl)amino alcohols, a new class of antitumor DNA intercalators. Discovery and antitumor amine side chain structure-activity studies. *J. Med. Chem.* **33**: 2385-2393.

- BALLS, M. & HORNER, S.A. (1985). The FRAME interlaboratory programme on *in vitro* cytotoxicology. *Food Chem. Toxicol.*, **23**: 209-213.
- BALLS, M.; BLAAUBOER, B.; BRUZICK, D.; FRAZIER, J.; LAMB, D.; PEMBERTON, M.; REINHARDT, C.; ROBERFROID, M.; ROSENKRANZ, H.; SCHIMD, B.; SPIELMAN, H.; STAMMATI, A.L. & WALUM, E. (1990). Report and recommendations of the CAAT/ERGAAT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA*, **18**: 313-337.
- BALLS, M. (1992). *In vitro* test validation: high hurdling but not pole vaulting. *ATLA*, **20**: 355-357.
- BALLS, M. & FENSTEM, J.H. (1992). The use of basal cytotoxicity and target organ toxicity tests in hazard identification and risk assessment. *ATLA*, **20**: 368-388.
- BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; FENSTEM, J.H.; BRUNER, L.; COMBES, R.D.; EKWALL, B.; FIELDER, R.J.; GUILLOUZO, A.; LEWIS, R.W.; LOVELL, D.P.; REINHARDT, D.A.; REPETTO, G.; SLADOWSKI, D.; SPIELMANN, H. & ZUCCO, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. *ATLA*, **23**: 129-147.

- BARRATT, M.D. (1995). Quantitative structure activity relationships for skin corrosivity of organic acids, bases and phenols. *Toxicol. Lett.*, **75**: 169-176.
- BORENFREUND, E. & PUERNER, J. A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Cult. Meth.*, **9**: 7-9.
- BORENFREUND, E. & PUERNER, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**:119-124
- BONDESSON, I., EKWALL, B., HELBERG, S., ROMERT, L., STENBERG, K. & WALUM, E. (1989). MEIC-a new international multicenter project to evaluate the relevance to human toxicity of in vitro cytotoxicity tests. *Cell. Biol. Toxicol.*, **5**:331- 347.
- BOSTWICK, J.R., ABBE, R., SUN, J. & APPEL, S.H. (1992). Amino Alcohol modulation of hippocampal acetylcholine release. *Neuro Report*, **3**: 425-428.
- BOSTWICK, J. R.; ABBE, R & APPEL, S. H.(1993). Modulation of acetylcholine release in rat hippocampus by aminoalcohols and Bay K 8644. *Brain Res.*, **629**:79-87

- BRADLEY, M. O., BHUYAN, B., FRANCIS, M. C., LANGENBACH, R., PETERSON, A & HUBERMAN, E. (1981). Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutat. Res.*, **87**:81-142.
- BRUNER, L.H.; CARR, G.J.; CHAMBERLAIN, M. & CURREN, R.D. (1996). Validation of alternative methods for toxicity testing. *Toxicol. In Vitro*, **10**: 479-501.
- CAPUCCI, M.S. (1990). Ação tóxica da estreptozotocina em culturas celulares de mamíferos. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 91 p.
- CAPUCCI, M.S.; HOFFMANN, M.E. & NATARAJAN, A.T. (1995a). Streptozotocin-induced genotoxic effects in Chinese hamster cells: The resistance phenotype of V79 cells. *Mutat. Res.*, **347**: 79-85.
- CAPUCCI, M.S., HOFFMANN, M.E., GROOT, A. De & NATARAJAN, A.T. (1995b). Streptozotocin-induced Toxicity in CHO-9 and V79 cells. *Environ. Mol. Mutag.* **26**: 72-78
- CHIU, S-H. L. (1993). The use of in vitro metabolism studies in understanding of new drugs. *J. Pharm. Toxicol. Meth.*, **29**(2)77-83.

CHU, I. (1995). Alternative methods to animal testing: A Canadian Health Protection Branch Perspective. *ATLA*, **23**: 257-261.

CKLESS, K. (1996). Autoxidação da apomorfina e seus efeitos citotóxico e genotóxico em procariotos, eucariotos inferiores e em células de mamíferos. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 129 p.

CLEMEDSON, C., McFARLANE-ABDULLA, E., ANDERSSON, M., BARILE, F.A., CALLEJA, M.C., CHESNÉ, C., CLOTHIER, R., COTTIN, M., CURREN, R., DANIEL-SZOLGAY, E., DIERICKX, P., FERRO M., FISKESJÖ, G., GARZA-OCAÑAS, L., GÓMEZ-LECHÓN, M.J., GÜLDEN, M., ISOMAA, B., JANUS, J., JUDGE, P., KAHRU, A., KEMP, R.B., KERSZMAN, G., KRISTEN, U., KUNIMOTO, M., KÄRENLAMPI, S., LAVRIJSEN, K., LEWAN, L., LILIUS, H., OHNO, T., PERSONE, G., ROGUET, R., ROMERT, L., SAWYER, T.W., SEIBERT, H., SHRIVASTAVA, R., STAMMATI, A., TANAKA, N., TORRES-ALANIS, O., VOSS, J-U., WAKURI, S., WALUM, E., WANG, X., ZUCCO, F. & EKWALL, B. (1996). MEIC evaluation of acute systematic toxicity. Part I: methodology of 68 *In Vitro* toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals. *ATLA* **24**: 251-272.

CLOTHIER, R.H.; ATKINSON, K.A.; GARLE, M.J.; WARD, R.K. & WILLSHAW, A. (1995). The development and evaluation of *in vitro* tests by the FRAME alternatives laboratory. *ATLA*, **23**: 75-90.

COMMITTEE 17 (1975). Environmental mutagenic hazards. *Science*, **187**:503-514.

CORNELIS, M., DUPONT, C. & WEPIERRE, J. (1991). *In vitro* cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict the toxic potential of surfactants. *ATLA*, **19**: 234-337.

DeIRASO, N.J. (1993). *In vitro* methodologies for enhanced toxicity testing. *Toxicol. Lett.*, **68**:91-99.

EKWALL, B. (1980) Screening of toxic compounds in tissue culture. *Toxicology*, **17**:127-142.

EKWALL, B. (1983) Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **407**:64-77.

EKWALL, B. & EKWALL, K. (1988). Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *ATLA*, **15**: 193-201.

EKWALL, B., BONDESSON. I., CASTELL, J. V., GOMEZ-LECHON, M. J., HELBERG S., HOGBERG, J., JOVER, R., PONSODA, X., ROMERT, L., STENBERG K. &

- WALLUM, E. (1989). Cytotoxicity evaluation of the first ten MEIC chemicals: acute lethal toxicity in man predicted by cytotoxicity in five cellular assays and oral LD<sub>50</sub> tests in rodents. *ATLA*, 17:83-100.
- FADDEEVA, M.D. & BELIAEVA, T.N. (1991). DNA intercalators: their interaction with DNA and other cell components and their use in biological research. *Tsitologiya*, 33: 3-31.
- FAUTREL, A.; CHESNE, C.; GUILLOUZO, A.; de SOUSA, G.; PLACIDI, M.; RAHMANI, R.; BRAUT, F.; PICHON, J.; HOELLINGER, H.; VINTEZOU, P.; DIARTE, I.; MELCION, C.; CORDIER, A.; LORENZON, G.; BENICOURT, M.; VANNIER, B.; FOURNEX, R.; PELOUX, A.F.; BICHET, N.; GUOY, D. & CANO, J.P. (1991). A multicentre study of acute *in vitro* cytotoxicity in rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*, 5: 543-547
- FENTEM, J. H., HAMMOND, A. H., GARLE, M. J. & FRY, J.R. (1992). Toxicity of coumarin and various methyl derivatives in cultures of rat hepatocytes and V79 cells. *Toxicol. In Vitro*, 6:21-25
- FRY, J.F.; HAMMOND, A.H.; GARLE, M.J. & LAL, K. (1993). Comparison of xenobiotic-mediated cytotoxicity in rat hepatocytes and V79 chinese hamster lung fibroblast cell line:

can metabolically-activated hepatotoxins be identified by selective cytotoxicity to hepatocytes? *ATLA*, **21**: 8-12

FRAZIER, J. M. (1990). Multiple endpoint measurements to evaluate the intrinsic cellular toxicity of chemicals. *J. Molec. Cell. Toxicol.* **3**:349-357.

FRAZIER, J.M. (1993). In vitro models for toxicological research and testing. *Toxicol. Lett.* **68**:73-90.

FRIEDBERG, E.C. (1985). DNA damage tolerance in prokariotic cell. In: *DNA repair*. W.H. Freeman and Company, New York, cap. 7, 375-457.

GAD, S. C. (1990). Recent developments in replacing, reducing and refining animal use in toxicology research and testing. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **15**:8-15.

GESZTESI, J. L. (1990). Ação de ésteres de sacarose em cultura de tecido. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 139 p.

GETTINGS, S.D. (1992). Update on *in vitro* alternatives development. *Cosmetics & Toiletries*, **107** (november): 71-80.

GETTINGS, S.D.; LORDO, R.A.; HINTZE, K.L.; BAGLEY, D.M.; CASTERTON., P.L.; CHUDKOWSKY, M.; CURREN, R.D.; DEMETRULIAS, J.L.; DIPASQUALE, L.C.; EARL, L.K.; FEDER, P.I.; GALLI, C.L.; GLAZA, S.M.; GORDON, V.C.; JANUS, J.; KURTZ, P.J.; MARENUS, K.D., MORAL, J.; PAPE, W.J.W., RENSKERS, H.J., RHEINS, L.A.; RODDY, M.T.; ROZEN, M.G.; TEDESCHI, J.P. & ZYRACHI, J. (1996). The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase III) surfactant-based formulations. *Food Chem. Toxicol.* **34(1)**: 79-117.

GEVORGYAN, G. A., AGABABYAN, A.G. & MNDZHOYAN, O.L. (1984). Advances in the chemistry of  $\beta$ -Aminoketones. *Russ. Chem. Rev.*, **53**:(6)561-581.

GOLBERG, L. (1986). Charting a course for cell culture alternatives to animal testing . *Fundam. Appl. Toxicol.*, **6**:607-616.

GROTH, T.; FALCK, P. & MIETHKE, R-R. (1995). Cytotoxicity of biomaterials - Basic mechanisms and *in vitro* test methods: A review. *ATLA*, **23**: 790-799.

GRYZARD, G.; CRONENBERGER, L. & PACHECO, H. (1973). Preparation et etude de structure de alpha amino-alcools, de

$\beta$ -amino-alcools et de amino-propenes. *Bull. Soc. Chim. Fr.*  
174:1070-1078.

HALLE, W.; BAEGER, I.; EKWALL, B. & SPIELMANN, H.  
(1991). Correlation between *in vitro* cytotoxicity and octanol  
water partition coefficients of 29 substances from the MEIC  
programme. *ATLA*, 19: 338-343.

HARRIS, M. I. & BRAGA, A. C. (1991a) Studies about the  
diastereoselectivity of the reduction of  $\beta$ -enaminoketones  
with  $\text{NaBH}_4$ . Synthesis of the 4H-1,3-oxazines. *An. Soc.  
Bras. Quim.*, QO-068.

HARRIS, M. I. & HERRERA-BRAGA, A. C. (1991b). Obtenção  
de  $\gamma$ -aminoálcoois via redução de  $\beta$ -enaminocetonas com  
 $\text{NaBH}_4$ . *An. Enc. Nac. Quim. (São Carlos)*, p. 178.

HARRIS, M.I. (1994). "Alguns estudos sobre reduções de  $\beta$ -  
enamino-cetonas. Síntese de  $\gamma$ -aminoálcoois e  $\beta$ -amino-  
cetonas. Ensaio sobre a utilização de fermento de pão  
(*Saccharomyces cerevisiae*)". Tese (Doutorado em Química),  
Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas,  
UNICAMP, 216 p.

HENRY, R.J.; CHIAMORI, N.; GOLUB, O.J.; BERKMAN, S.  
(1960). Revised spectrofotometric methods for the  
determination of glutamic-oxaloacetic transaminase, glutamic-

pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **34**: 381-398.

JACOBI, H.; KRIEGER, G.; & WITTE, I. (1995). Characterization and applicability of a cytotoxicity assay determining growth inhibition after a 1-hour treatment with xenobiotics in human cell culture. *Toxicol. In Vitro*, **9** (5): 751-756.

JANSSON, K. & JANSSON, V. (1993). The toxicity of chlorophenols in V 79 Chinese hamster cells. *Toxicol. Lett.*, **69**:289-294.

KNOX, P., UPHILL, P. F., FRY, J. R., BENFORD, J. & BALLS, M. (1986). The FRAME multicentre project on in vitro cytotoxicology. *Food. Chem. Toxicol.*, **24**:457-463.

KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J. (1982). Aspectos teóricos da ação de fármacos. In: *QUÍMICA FARMACÊUTICA*. Editora Guanabara Dois, Rio de Janeiro, cap. **3**: 84-123.

LIN, C.H.; SVENSON, S.R.; LAHTI, R.A.; MacCALL, R.B.; PIERCEY, M.F.; SCHEREUR, P.J.K.D.; Von VOIGTLANDER, P.F. & CHIDESTER, C.G. (1993). Centrally acting serotonergic agents. Synthesis and structure-activity relationships of C-1 or C-3 substituted derivatives of 8-

hydroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin. *J. Med. Chem.*, **36**: 671-682

LOPRIENO, N.; BOSCO, E.; BONCRISTIANI, G.; NIERI, M. & LOPRIENO, G. (1993). The Galileo Data Bank of toxicity testing with *in vitro* alternative methods . I. General structure. *ATLA*, **22**: 20-30.

LOPRIENO, N.; BONCRISTIANI, G.; BOSCO, E.; NIERI, M. & LOPRIENO, G. (1994). The Galileo Data Bank on toxicity testing with *in vitro* alternatives methods. II. Toxicology profiles of 20 chemicals. *ATLA*, **22**: 82-114.

MAUGH, T. M. (1978). Chemicals: How many are there ?  
*Science*, **199**(4325):162.

MITCHELL, D. B., SANTONE, K. S. & ACOSTA, D. (1980).  
Evaluation of cytotoxicity in cultured cells by enzyme leakage.  
*J. Tissue Cult. Meth.*, **6**:113-116.

MUUL, I., HEGYELI, A. F., DACRE, J. C. & WOODARD, G.  
(1976). Toxicological testing dilemma. *Science*, **193**(4256):834.

NARDONE, R. M. (1980). The interface of toxicology and tissue culture and reflections on the carnation test. *Toxicology*, **17**:105-111

- NEMES, Z.; DIETZ, R.; LUTH, J.B.; GOMBA, S., HACKENTHAL, F. & GROSS, F. (1979). The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia*, **35**: 1475-1476.
- OHNO, T., ITAGAKI, H., TANAKA, N. & ONO, H. (1995). Validation Study on five different cytotoxicity assays in Japan - an intermediate report. *Toxicol. In Vitro*, **9** (4): 571-576.
- OLIVIER, P., TESTARD, P., MARZIN, D. & ABBOTT, D. (1995). Effect of high polyol concentrations on neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hepatocytes in primary culture. *Toxicol. In Vitro*, **9** (2): 133-138
- PAINTER, R.B. (1977). Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature*, **265**: 650-651
- REPETTO, G. & SANZ, P. (1993). Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: *In Vitro* effects of 24 metals. *ATLA*, **21**: 501-507.
- ROMERT, L.; JANSSON, T. & JENSSEN, D. (1994). The cytotoxicity of 50 chemicals from the MEIC study determined by growth inhibition of Ascites Sarcoma BP8 cells: a comparison with acute toxicity data in man and rodents. *Toxicol. Lett.*, **71**: 39-46.

- ROWAN, A. N. & GOLDBERG, A. M. (1985). Perspectives alternatives to current animal testing techniques in preclinical toxicology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**: 225-247.
- SEIBERT, H.; BALLS, M.; FENTEM, J.H.; BIANCHI, V.; CLOTHIER, R.H.; DIERICKX, P.J.; EKWALL, B.; GARLE, M.J.; GÓMEZ-LECHON, M.J.; GRIBALDO, L.; GÜLDEN, M.; LIEBSCH, M.; RASMUSSEN, E.; ROGUET, R.; SHRIVASTAVA, R. & WALUM, E. (1996). Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. *ATLA*: **24**: 499-510.
- SEWELL, R.B., SOONG LING, T., YEACOMANS, N.D. (1986). Ethanol-induced cell damage in cultured rat antral mucosa assessed by chromium-51 release. *Dig. Dis. Sci.* **31**(8):853-858.
- SHAW, A.J. (1994). Defining cell viability and cytotoxicity. *ATLA*, **22**, 124-126.
- SHOPSIS, C. & SATHE, S. (1984). Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test: correlations with the Draize test. *Toxicology*, **29**:195-206.
- SHOPSIS, C., BORENFREUND, E., WALBERG, J. & STARK, D. M. (1985). A battery of potential alternatives to the Draize test: uridine uptake inhibition, morphological cytotoxicity,

macrophage chemotaxis and exfoliative cytology. *Food. Chem. Toxicol.*, **23**:259-266

SHOP SIS, C., BORENFREUND, E. & STARK, D. M. (1987).

Validation studies on a battery of potential in vitro alternatives to the Draize test. In: Goldberg, A.M. ed. *Alternative Methods in Toxicology*, N.Y: MaryAnn Liebert, Inc., **5**:31-44.

SILBER, P.M. & RUEGG, C. E. (1992). *In vitro* assays.

*Cosmetics & toiletries*. **107** (jun): 71-78.

SLAMENOVA, D., GABELOVA, A. & RUPPOVA, K. (1992).

Cytotoxicity and genotoxicity testing of sodium fluoride on Chinese hamster V79 cells and human EUE cells. *Mutat. Res.* **279**:109-115.

SOUZA-PINTO, N.C. (1993). Envolvimento do cálcio no mecanismo de citotoxicidade do pró-oxidante tetrahidroxibenzoquinona. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 95 p.

SOUZA-PINTO, N. C., VERCESI, A.E. & HOFFMANN, M.E.

(1996). Mechanism of tetrahydroxy-1,4-quinone cytotoxicity: involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}$  in the impairment of DNA

replication and mitochondrial function. *Free Rad. Biol. Med.* 20(5): 657-666.

SOUZA-PINTO, N.C. (1997). "Mecanismo de ação letal da tetrahydroquinona em fibroblastos V79". Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, 150 p.

STEVENSON, D. E. (1979). Current problems in the choice of animals for toxicity testing. *J. Toxicol. Environ. Health*, 5:9-15.

TARDIFF, R. G. (1978). In vitro methods of toxicity evaluation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 18: 357-369.

TOROASON, M., BOHRMAN, J. S. & KRIEG, E. (1992). Evaluation of the V79 cell metabolic co-operation assay as a screen in vitro for developmental toxicants. *Toxicol. In Vitro*, 6(2):165-174

TRIGLIA, D., BRAA, S. S., YONAN, C. & NAUGHTON, G. K. (1991). In vitro toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. *In Vitro Cell. & Dev. Biol.* 27A: 239-244.

- WALUM, E., CLEMEDSON, C.& EKWALL, B. (1994).  
Principles for the validation of in vitro toxicology test methods.  
*Toxicol. In Vitro*, **8**: 807-812.
- WEATHERALL, M. (1982). An end to the search for new drugs ?  
*Nature*, **269**:387-390.
- WITTE, I.; FRAHMANN, E. & JACOBI, H. (1995). Comparison  
of the sensitivity of three toxicity tests determining survival,  
inhibition of growth and of colony forming ability in human  
fibroblasts after incubation with environmental chemicals.  
*Toxicol. In Vitro*, **9**: 327-331.

## VII. ANEXO

### COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS REFERENTES A ESTE TRABALHO

1. SORAGGI, C.L.; HARRIS, M.I.; BRAGA, A.C.H. & HOFFMANN, M.E. (1996). Cytotoxicity of  $\gamma$ -aminoalcohols and their cyclic oxazines toward V79 cells. *Resumos da XXV Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, Caxambu, MG, O<sub>18</sub>-p.149.

2. HARRIS, M.I.N.C.; SORAGGI, C.L.; HOFFMANN, M.E. & BRAGA, A.C.H. (1995). Estudo da conformação de  $\gamma$ -aminoálcoois. *Resumos da 18<sup>a</sup> Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, Caxambu, MG, SA-011.

3. SORAGGI, C.L.; HARRIS, M.I.; BRAGA, A.C.H. & HOFFMANN, M.E. (1994 a). *In vitro* toxicity of new  $\beta$ -aminoketone derivatives. *Resumos da II Reunião da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental*, Gramado, RS, p.50.

4. SORAGGI, C.L.; HARRIS, M.I.; BRAGA, A.C.H. & HOFFMANN, M.E. (1994 b). *In vitro* toxicity of new  $\beta$ -aminoketone derivatives. *Resumos da XXIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, Caxambu, MG, O<sub>2</sub>-p.159.