



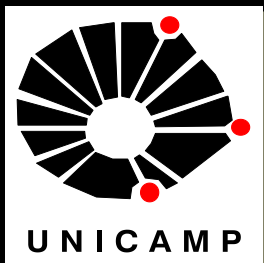
**I SIMPÓSIO INTERNACIONAL
EM INVESTIGAÇÕES
QUÍMICO-FARMACÊUTICAS**

Uso de testes *in vitro* para triagem farmacológica

Dra. Ana Lúcia T. G. Ruiz

Pesquisadora

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Unicamp



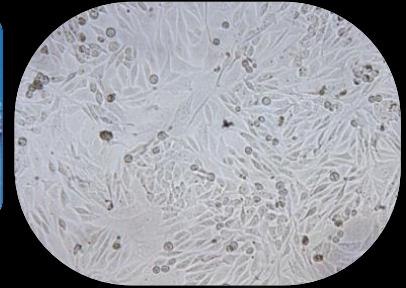
Introdução

Fase Pré-clínica

Testes *in vitro*

- ✓ Reações químicas,
- ✓ Cultura de células e de microrganismos;

Testes *in vivo*



Fase Clínica

Fases I, II, III e IV



Introdução

Grupo de pesquisa:

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz



Química, Farmacologia e Toxicologia de Substâncias Bioativas:

➤ Produtos Naturais

Obtidos a partir de processos fitoquímicos

Obtidos a partir de síntese orgânica (incluindo síntese de análogos e derivados)*

➤ Alimentos Funcionais*

➤ Complexos Metálicos (Química Inorgânica)*

* Colaborações com diversos grupos do Brasil e Exterior

Farmacologia e Toxicologia de Substâncias Bioativas

In vitro

Painel: 15 linhagens tumorais humanas, 2 linhagens tumorais murinas, 9 linhagens imortalizadas (2 humanas e 7 outros mamíferos), 2 linhagens finitas de fibroblastos humanos.

- ✓ Câncer:

atividade anti-proliferativa, mecanismos de morte celular, ciclo celular, teste clonogênico, etc.

- ✓ Cicatrização:

indução de proliferação, migração celular, produção de colágeno, etc;

- ✓ Inflamação (produção de citocinas*);

- ✓ Toxicologia experimental

Mutagenicidade – indução de micronúcleos

Genotoxicidade – teste Cometa (fragmentação de DNA)

Estudos *in vitro*

Material de Estudo

Células Intactas

Células Lisadas

Meio de cultura

Técnica

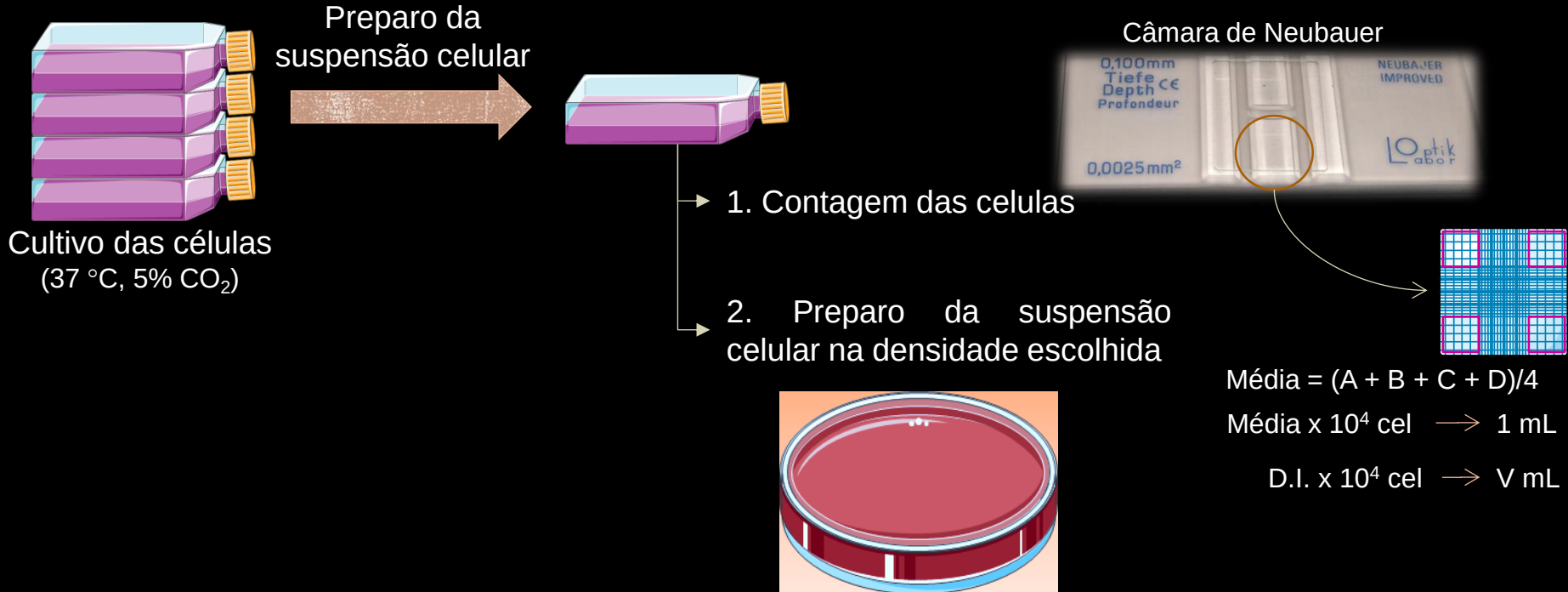
Microscopia

Citometria de Fluxo

Outras Técnicas



Começando um experimento...



Piper regnellii (Miq.) C.DC. var. *regnellii*

<http://webdm.cpqba.unicamp.br/cpma/fotos/221.jpg>



- ❖ Família: Piperaceae
- ❖ Nome popular: caapeba, pariparoba
- ❖ Uso popular: infusões e emplastos de folhas e raízes para tratamento de feridas, redução de inchaços, irritações na pele e infecções;
- ❖ Estudos fitoquímicos prévios: fenilpropanoides e neolignanais;
- ❖ Estudos farmacológicos prévios: atividades antifúngica, antibacteriana, anti-tripanosossoma;

Piper regnellii (Miq.) C.DC. var. *regnellii*

<http://webdrm.cpqba.unicamp.br/cpma/fotos/221.jpg>

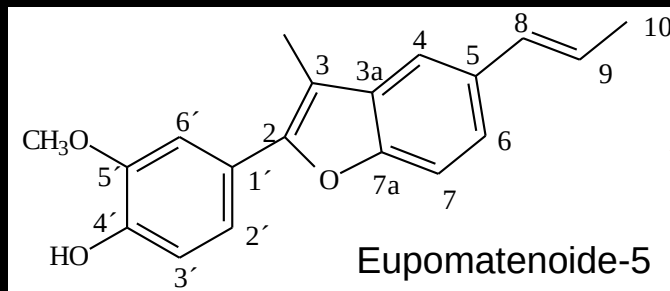


Folhas secas
e moidas

Extração
sucessiva por
maceração

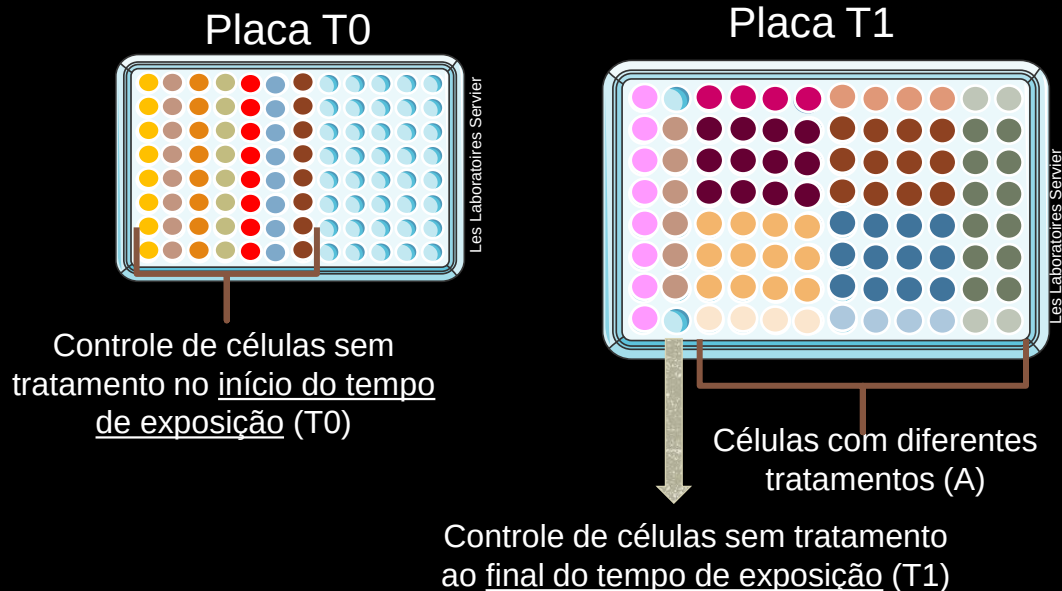
Ext. Hexano

Ext. DCM



1. Cromatografia em coluna;
2. Recristalização da fração mais ativa

Proliferação celular (protocolo NCI60)



Resultado

$$\text{Se } T0 \leq A \quad 100\% - (T1-T0) \\ X\% - (A-T0)$$

X (%) = proliferação celular

$$\text{Se } T0 > A \quad 100\% - (T0) \\ X\% - (A-T0)$$

X (%) = proliferação celular

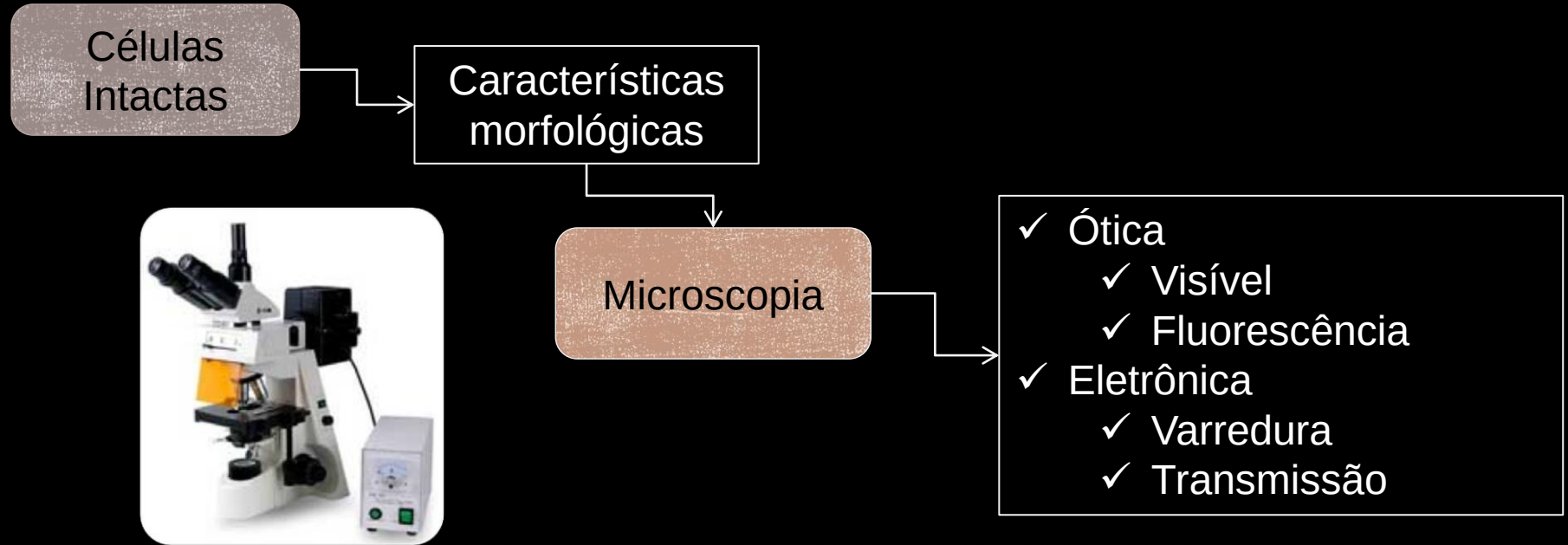
Piper regnellii (Miq.) C.DC. var. *regnellii*

<http://webdm.cpqba.unicamp.br/cpma/fotos/221.jpg>

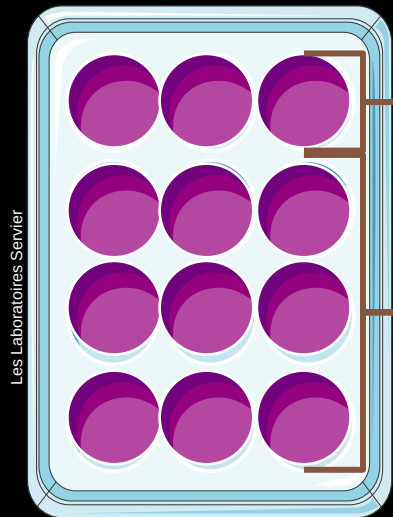


Cell Lines	TGI ($\mu\text{g/mL}$) ^b			
	DCE	FRB	EUP-5 ^c	DOX ^d
Melanoma (UACC-62)	26.45	10.18	8.21	0.05
Breast (MCF7)	39.58	10.77	6.24	3.10
Kidney (786-0)	21.93	8.33	1.93	4.97
Lung (NCI-H460)	20.39	6.09	10.26	0.81
Prostate (PC-3)	10.97	5.44	6.17	3.19
Ovary (OVCAR-3)	12.05	17.61	5.50	0.07
Colon (HT29)	42.09	12.39	14.28	14.88
Leukemia (K-562)	158.44	19.21	99.63	1.29

Características morfológicas



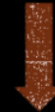
Microscopia Eletrônica de Varredura



Células sem
tratamento ao final do
tempo de exposição

Células com
tratamentos ao final
do tempo de
exposição

- * Preparação da suspensão celular;
- * Fixação das células (glutaraldeído/formaldeído);
- * Pós fixação (tetróxido de ósmio);
- * Preparação da suspensão celular para avaliação em microscopia eletrônica de varredura



Aquisição das
Imagens

A

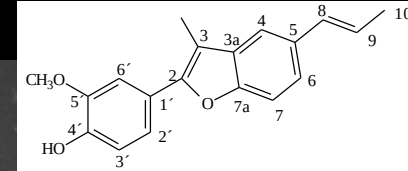
EHT = 10.00 kV Mag = 16.20 K X Signal A = SE1
WD = 8.0 mm I Probe = 100 pA VP Target = 100 Pa

B

EHT = 5.00 kV Mag = 14.14 K X Signal A = SE1
WD = 8.0 mm I Probe = 100 pA VP Target = 100 Pa

C

EHT = 5.00 kV Mag = 8.46 K X Signal A = SE1
WD = 8.5 mm I Probe = 100 pA VP Target = 100 Pa



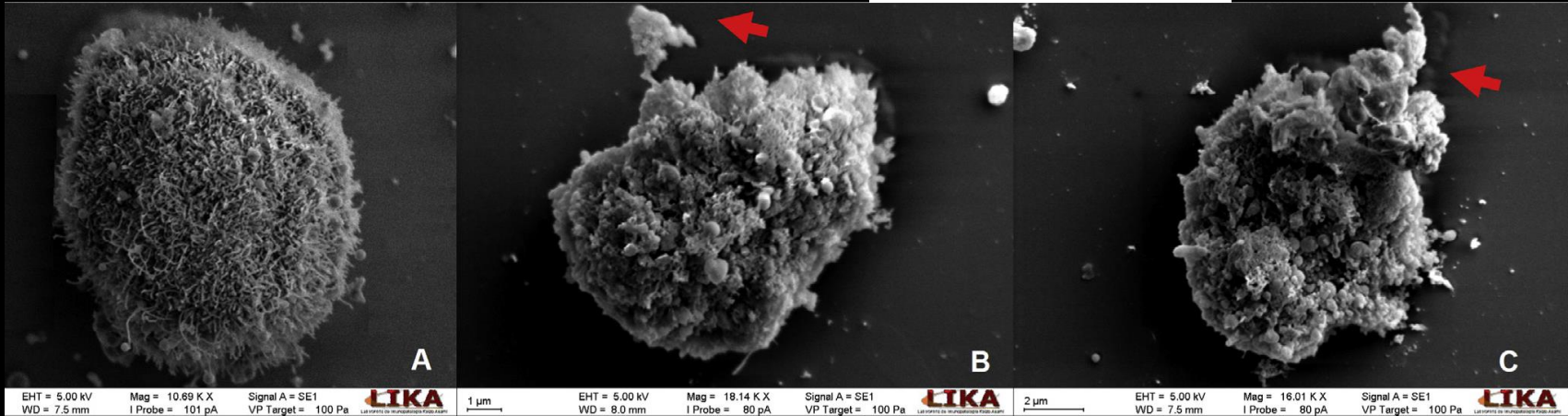
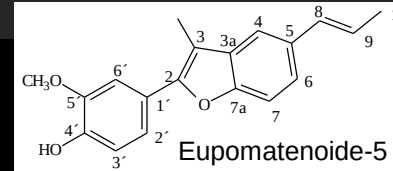
Eupomatenoide-5

(A) Células não tratadas (B e C) Células tratadas por 6h com eupomatenoide-5 (51μM), a 37 °C, 5% CO₂

Piper regnellii (Miq.) C.DC. var. *regnellii*



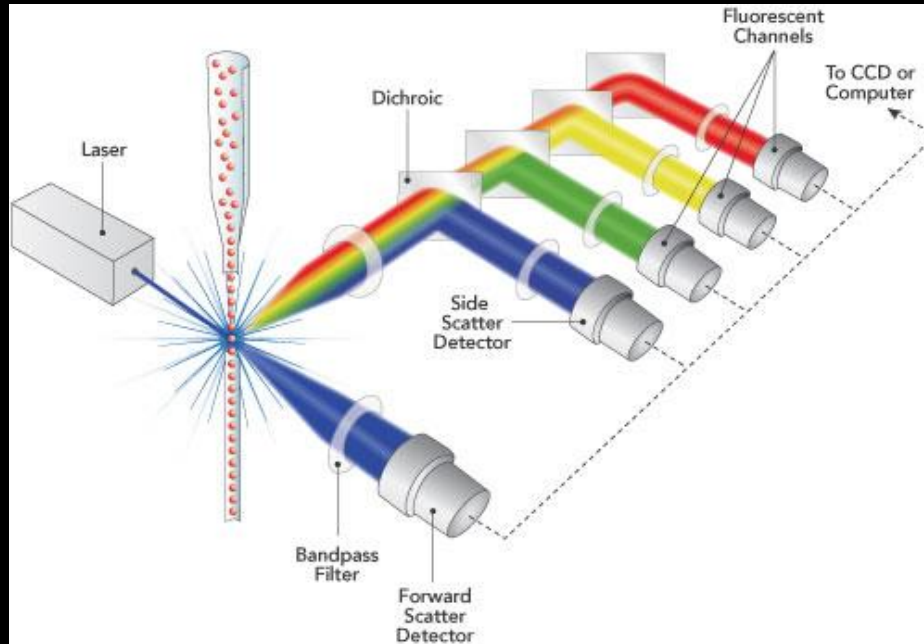
Linhagem: 786-0



Imagens por microscopia eletrônica de varredura

(A) Células não tratadas (B e C) Células tratadas por 6h com eupomatenóide-5 (51 μ M), a 37 °C, 5% CO₂

Citometria de Fluxo

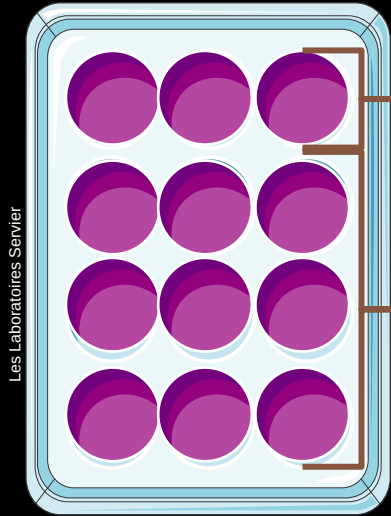
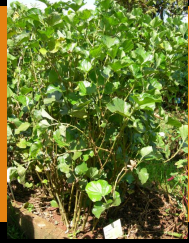


Análise simultânea multiparamétrica
de células e/ou partículas
(geralmente de 0,2 a 50 μm) em
suspensão, por meio de um sistema
de fluxo contínuo.

Informações Morfológicas:
Forward Scatter e *Side Scatter*
Informações Bioquímicas:
Marcadores fluorescentes

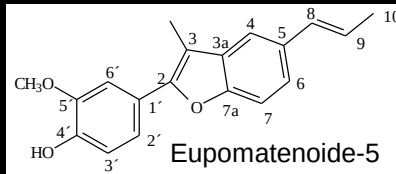
Citometria de Fluxo

Piper regnellii (Miq.) C.DC. var. *regnellii*

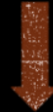


Células sem
tratamento ao final do
tempo de exposição

Células tratadas com
Eup-5 em diferentes
tempo de exposição



- * Preparação da suspensão celular;
- * Tratamento das células com o(s) fluoróforo(s) adequado(s);
- * Incubação no escuro à temp. amb.

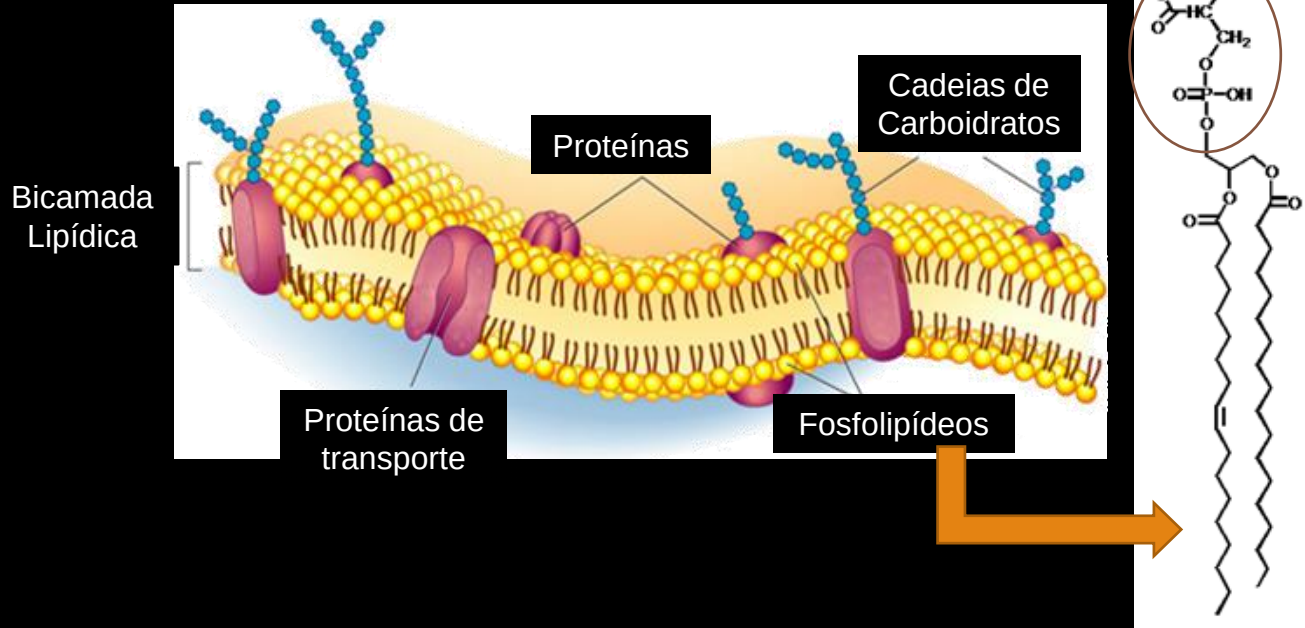


Leitura das células no citômetro
(5 a 10 mil eventos)

Citometria de Fluxo - Avaliação de exposição de resíduos de fosfatidilserina

<http://www.byrdwell.com/PhosphatidylSerine/image16791.gif>

<https://www.getoptimind.com/phosphatidylserine-benefits-that-change-lives/>

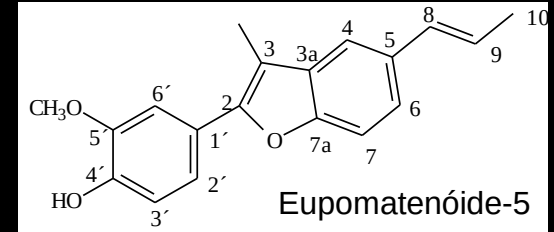
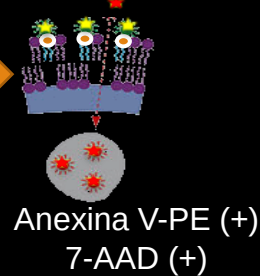
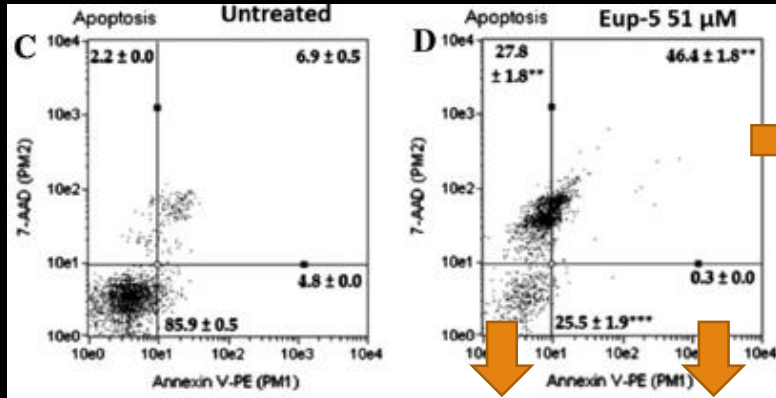
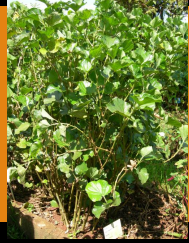


Exposição de resíduos PS:

- Sinalização “Eat me”
- relacionada com início de processos de morte celular:
 - apoptose,
 - parthantos;
 - netose.

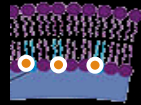
Citometria de Fluxo

Piper regnellii (Miq.) C.DC. var. *regnellii*



Linhagem: MCF-7
Tempo de incubação: 12h
Conc. Eup-5: 51μM

Anexina V-PE (-)
7-AAD (-)



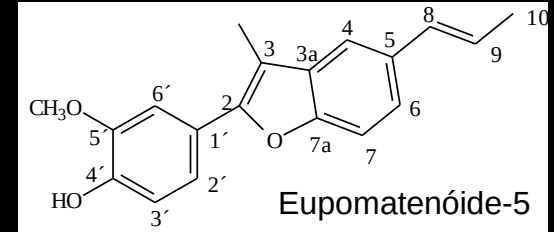
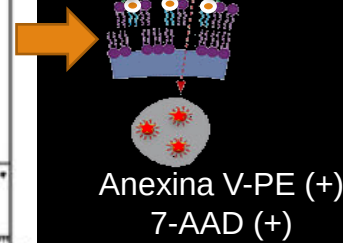
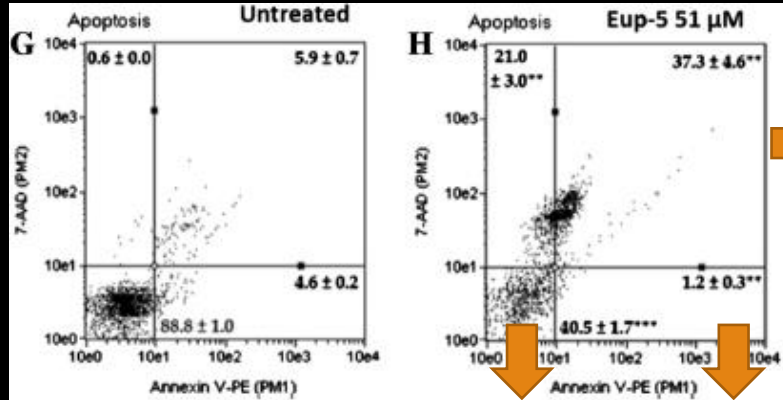
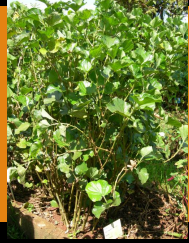
Anexina V-PE (+)
7-AAD (-)



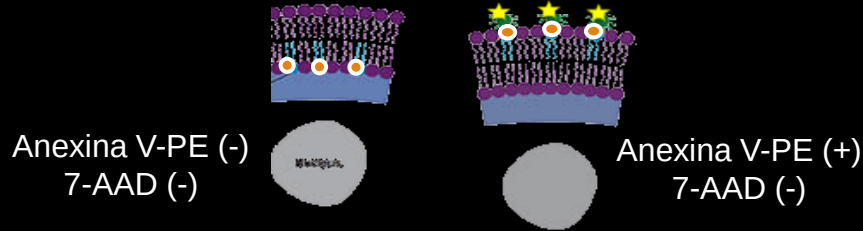
○ Resíduo PS ★ Anexina V-PE ★ 7-AAD

Citometria de Fluxo

Piper regnellii (Miq.) C.DC. var. *regnellii*



Linhagem: 786-0
Tempo de incubação: 12h
Conc. Eup-5: 51 μ M



● Resíduo PS ★ Anexina V-PE ★ 7-AAD

Sobre as Caspases

Caspases (Cysteine-ASPartic proteASES)

- * Enzimas proteolíticas envolvidas com homeostase celular
- * Processos de morte celular (apoptoses, piroptose, necroptose, catástrofe mitótica e autofagia):

Caspase-2, -3, -7, -8, -9 e -10

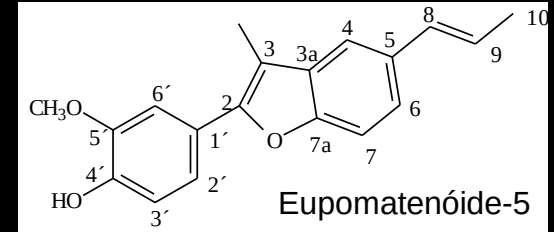
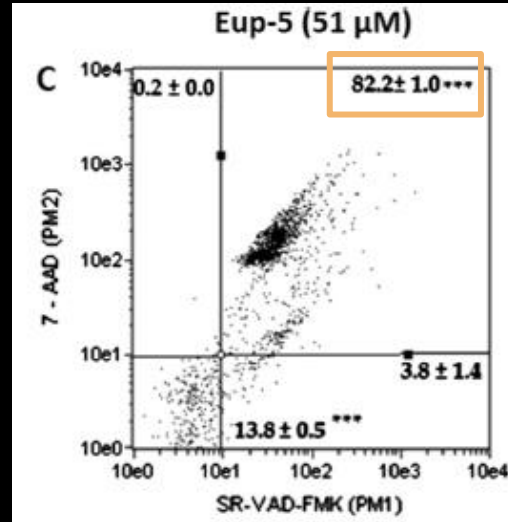
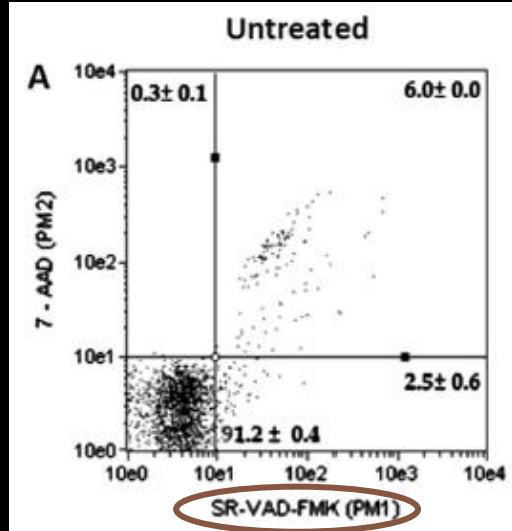
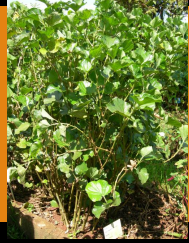
- * Processo inflamatório:

Caspase-1, -4, -5, -11 e -12

- * Funções não relacionadas a processos de morte celular: proliferação, supressão tumoral, diferenciação, desenvolvimento neural e processo de envelhecimento celular.

Citometria de Fluxo

Piper regnellii (Miq.) C.DC. var. *regnellii*



Linhagem: MCF-7
Tempo de incubação: 6 h
Conc. Eup-5: 51 μ M

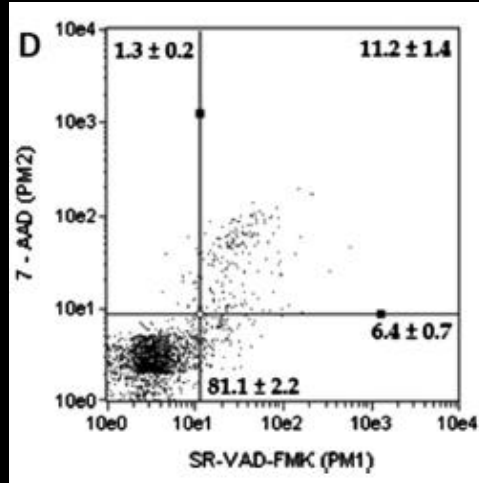
Inibidor inespecífico de Caspases
(ligado a um fluoróforo)

Citometria de Fluxo

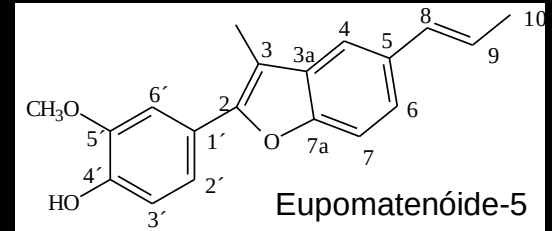
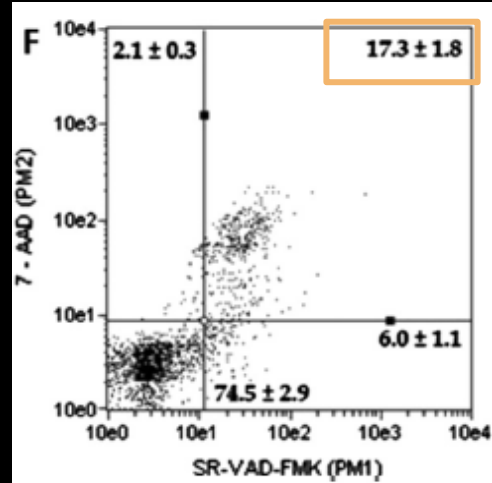
Piper regnellii (Miq.) C.DC. var. *regnellii*



Células não tratadas



Células tratadas



Linhagem: 786-0

Tempo de incubação: 6 h

Conc. Eup-5: 51 μM

Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot

Campo experimental CPQBA/UNICAMP Monteiro, K.M.



Família: Bignoniaceae

Nome popular: Pariri, Crajiru, Puca-panga, Coapiranga, Chica ou Cipó-cruz

Uso popular: cicatrizante, anti-inflamatório, antimicrobiano e tratamento de diarreia. Também usado por algumas tribos indígenas em tatuagens corporais.

Estudos fitoquímicos: Flavonoides (Antocianinas e antocianidinas), taninos e esteroides.

Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot

Campo experimental CPQBA/UNICAMP, Monteiro, K.M.



Folhas secas
e moídas

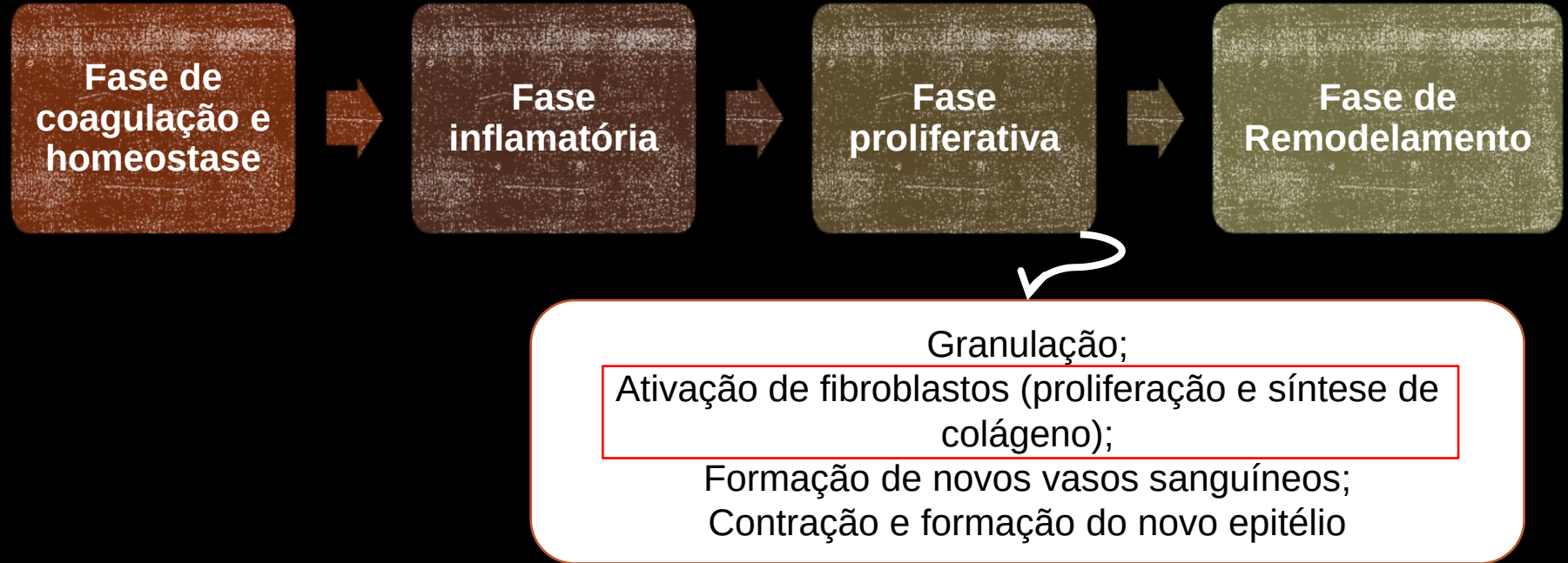
Extração
sucessiva por
maceração
(70% metanol
+ 0,3% ácido
citríco)

Extrato fluido

1. Eliminação
do metanol por
evaporação
2. Neutralização
3. Liofilização

Extrato de *A.
chica*

Cicatrização - Fases



Avaliação de atividade proliferativa



- Semelhanças:

- * Placas T1 e T0;

- * Faixa de concentração:
0,25 a 250 µg/mL

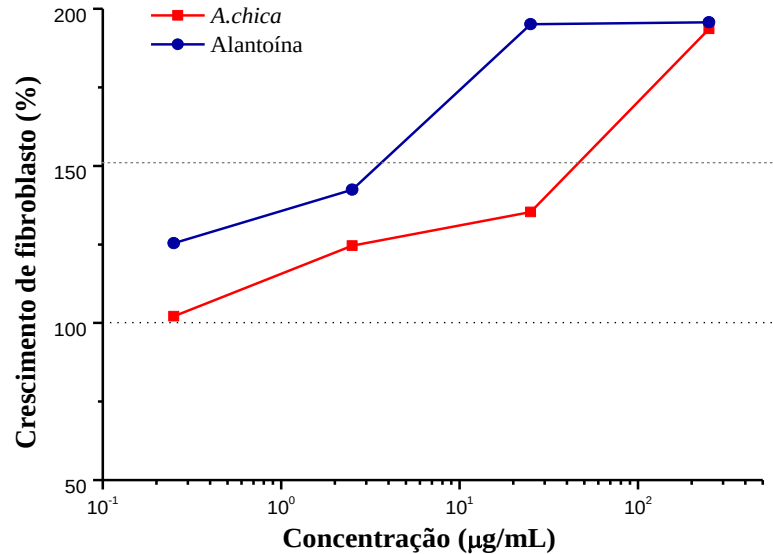
- Diferenças:

- * Carenciamento:

- Redução da concentração de Soro Fetal Bovino de 10% para 0,3%
 - Incubação por 72h antes do tratamento com amostra.

- * Após tratamento, incubação por 72h.

Avaliação de atividade proliferativa

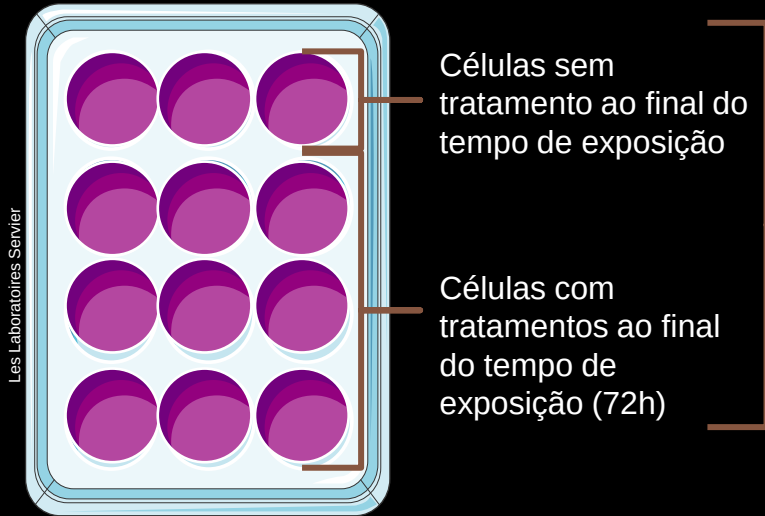


Tratamento:

Extrato de *Arrabidaea chica*;
Alantoina.

Linhagem: Fibroblastos dérmicos humanos
(cultura finita)

Dosagem de Colágeno

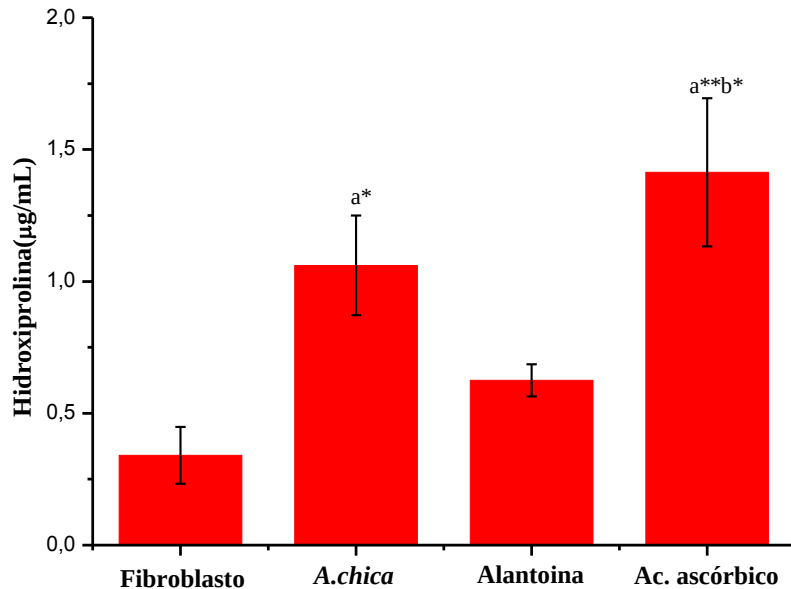


Coleta dos sobrenadantes
Hidrólise com NaCl 6N
(120°C, 20min)



1. Reação com Cloramina T
Temp. amb., 20min
2. Reação com corante de Ehrlich
65°C, 15 min
3. Leitura espectrofotométrica (550 nm)

Dosagem de Colágeno



Tratamento:

Extrato de *Arrabidaea chica* (250µg/mL);

Alantoina (250 µg/mL);

Acido ascórbico (25 µg/mL).

Linhagem: Fibroblastos dérmicos humanos
(cultura finita)

a: diferente do fibroblasto; **b:** diferente da alantoina, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$





Obrigado!
Gracias!
Thank you!



Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz
Pesquisadora, FCF/Unicamp
ana.ruiz@fcf.unicamp.br