

# **ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO JM-20 EM CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS**

Maria Eduarda de Andrade Galiciolli

dudagaliciolli@hotmail.com

Fernanda D'Avila da Silva, Bruna Candia Piccoli, Ana Carolina Irioda, Estael Ochoa-Rodríguez, Yanier Nuñez-Figueredo, João Batista Teixeira da Rocha, Nayara de Souza da Costa, Cláudia Sirlene Oliveira

A doença de Alzheimer é um transtorno neurodegenerativo, caracterizado pelo déficit de aprendizagem e perda de memória. Este processo patológico crônico é usualmente tratado com inibidores da acetilcolinesterase, porém além destes medicamentos apresentarem baixa eficácia, podem causar efeitos adversos ao paciente. Dessa forma, há necessidade de novas opções de tratamento, com efeitos colaterais menores ou ausentes. O JM-20 (3-etoxicarbonil-2-metil-4-(2-nitrofenil)-4,11-di-hidro-1H-pirido [2,3-b] [1,5] benzodiazepina) é reconhecido por sua ação inibidora da acetilcolinesterase, porém ainda não existem estudos sobre os efeitos desse composto em células saudáveis. Por este fato, o presente estudo teve como objetivo a avaliação da citotoxicidade (alterações no ciclo celular, hemólise, viabilidade celular e formação de espécies reativas) do JM-20 em leucócitos humanos, sendo considerado uma possibilidade inicial para os estudos de toxicidade com este composto. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética das Faculdades Pequeno Príncipe (nº 3.977.300). O sangue humano foi obtido de 6 voluntários saudáveis após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Para determinação da hemólise, o sangue foi coletado em tubos contendo heparina e centrifugado a 200g por 10 min, o plasma foi descartado e os sedimentos celulares foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (6,1 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM). Os eritrócitos foram incubados com 0, 1, 10 e 20  $\mu$ M de JM-20 por 3 h a 37° C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min, o sobrenadante foi transferido para uma microplaca e a lise dos eritrócitos foi medida em um espectrofotômetro a 540 nm. Para os demais testes foram utilizados leucócitos. Imediatamente após a coleta do sangue, foram adicionados 2 mL de 5% dextrana. Os tubos com sangue e dextrana foram mantidos em repouso por 1h. Após, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 200g por 10 min. O sedimento obtido foi lavado com 1 mL de solução de lise de hemácias, após este procedimento os leucócitos foram ressuspensos em meio de cultivo completo. Cerca de  $2 \times 10^5$  células foram expostas a 0, 10, 20 e 50  $\mu$ M de JM-20 por 3 h a 37° C. Após a incubação, foram avaliados o ciclo celular, a viabilidade celular e a produção de espécies reativas. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo no canal PERCP, utilizando 7-AAD; os dados foram processados pelo Software Flowing Infocyt V1.6.02.5. A viabilidade celular foi determinada usando o método de exclusão de azul de tripan; as células viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer. As espécies reativas foram avaliadas por citometria de fluxo no canal FITC, utilizando diclorofluorocéina diacetato; os dados foram processados pelo Software

Flowing Infnicyt V1.6.02.5. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 6 (versão 6.01, GraphPad Software, Inc., USA). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste pos hoc de Tukey. A ANOVA de uma via não revelou efeito do tratamento na indução de hemólise e no ciclo celular, ou seja, nas concentrações e períodos testados o JM-20 não causa hemólise, nem alterações no ciclo celular. Em relação à viabilidade celular, ANOVA de uma via revelou efeito do tratamento; a exposição ao JM-20 nas duas maiores concentrações (20 e 50  $\mu$ M) causou uma diminuição significativa na viabilidade celular (cerca de 20% e 55%, respectivamente) quando comparado às células não expostas. Por fim, quanto à avaliação dos níveis espécies reativas, ANOVA de uma via revelou efeito do tratamento; a exposição ao JM-20 aumentou significativamente os níveis de espécie reativas apenas na maior concentração testada (50  $\mu$ M) quando comparado as células não testadas. Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo demonstraram que o JM-20 causou citotoxicidade para os leucócitos apenas nas maiores concentrações testadas, possibilitando seu uso futuro para o tratamento da doença de Alzheimer. No entanto, mais estudos de toxicidade são necessários, incluindo pesquisas em organismos mais complexos.

**PALAVRAS-CHAVE:** citotoxicidade, JM-20, leucócitos.

#### **REFERÊNCIAS:**

FIGUEREDO, Yanier Nuñez et al. Characterization of the anxiolytic and sedative profile of JM-20: a novel benzodiazepine–dihydropyridine hybrid molecule. **Neurological Research**, v. 35, n. 8, p. 804-812, 2013.

DA SILVA, Fernanda D.'Avila et al. Molecular docking and in vitro evaluation of a new hybrid molecule (JM-20) on cholinesterase activity from different sources. **Biochimie**, v. 168, p. 297-306, 2020.

HUGHES, James P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.