

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CHAIRINI CÁSSIA THOMÉ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LÍQUIDOS IÔNICOS
IMIDAZÓLICOS EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA HUMANO E GLIOMA DE
RATO**

Porto Alegre
JUNHO/2015

CHAIRINI CÁSSIA THOMÉ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LÍQUIDOS IÔNICOS
IMIDAZÓLICOS EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA HUMANO E GLIOMA DE
RATO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre
JUNHO/2015

“Quem conheceu a alegria da compreensão conquistou um amigo infalível para a vida. O pensar é para o homem, o que é voar para os pássaros. Não toma como exemplo a galinha quando podes ser uma cotovia”

- Albert Einstein, 1951

Índice

Resumo.....	5
I. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Gliomas.....	6
1.1.1 Características e epidemiologia.....	6
1.1.2 Classificação.....	6
1.1.3 Glioblastoma.....	7
1.2. Líquidos iônicos imidazólicos.....	8
II. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivos gerais.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
III. Artigo Científico.....	11
3.1 Resumo.....	13
3.2 Introdução.....	14
3. Materiais e Métodos.....	15
3.3.1 Materiais.....	15
3.3.2 Cultivo celular.....	15
3.3.3 Preparação dos compostos e tratamentos.....	15
3.3.4 Ensaio Viabilidade Celular.....	16
3.3.5 Ensaio de Quantificação Celular.....	16
3.3.6 Ciclo Celular.....	17
3.3.7 Análise estatística.....	17
3.4 Resultados.....	17
3.4.1 Ensaio da Viabilidade Celular e da Quantificação Celular.....	17
3.4.2 Alterações morfológicas.....	18
3.4.3 Ciclo Celular.....	19
3.5 Discussão.....	20
3.6 Referências.....	22
3.7 Legendas Figuras.....	24
3.8 Figuras.....	25
IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	34
V. BIBLIOGRAFIA ADICIONAL.....	35

Resumo

Os Gliomas são tumores primários do Sistema Nervoso Central que representam aproximadamente 80% dos tumores malignos cerebrais. O Glioblastoma é o subtipo mais comum de glioma, sendo o mais agressivo e com alta malignidade. É um tumor heterogêneo, invasivo, com alta taxa proliferativa e alta resistência à quimioterapia, o que faz necessário o desenvolvimento de novas terapias. Os líquidos iônicos imidazólicos, ou sais imidazólicos, são compostos que possuem um anel imidazólico, cujo ponto de fusão se encontra abaixo de 100°C, e que possuem alta estabilidade química e termal. Estes sais são de grande interesse da indústria farmacêutica por possuírem um design flexível, o que possibilita modular suas propriedades químicas, físicas e biológicas a fim de realizar melhoramentos e obter um fármaco com ação mais eficiente. Na literatura, já foi descrito que os sais imidazólicos apresentam atividade antibacteriana e antifúngica. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito desses sais em células tumorais. Estudos anteriores mostraram que alguns sais imidazólicos possuem atividade antitumoral em várias linhagens tumorais, entre elas, linhagens de glioblastoma. Porém, não se sabe de que maneira esses compostos agem sobre as células tumorais. Desta forma, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a atividade antitumoral de sete sais imidazólicos (C_4MImCl , $C_{10}MImCl$, $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$, $C_{16}MImNTf_2$, $C_{18}MImCl$, $(C_{10})_2MImCl$) na proliferação e crescimento de linhagens de glioblastoma humano (U87-MG, U138 e M059J) e glioma de rato (C6) e avaliar seu possível mecanismo de ação. Como resultado, observamos que, exceto para os compostos C_4MImCl e $C_{10}MImCl$, as concentrações entre 0,125 e 6,0 $\mu g/mL$ de sais imidazólicos diminuíram o número total de células e a quantidade de células viáveis quando comparadas ao grupo veículo. Além disso, o tratamento com os sais também alterou a morfologia das células tumorais. Nas linhagens C6 e U87-MG os sais induziram parada no ciclo celular, visto que na linhagem M059J não houve alteração neste parâmetro. Na linhagem U138 foi presenciado um deslocamento das células para a fase G2. Com isso, é possível concluir que os sais imidazólicos apresentam atividade antitumoral em linhagens de glioblastoma humano e glioma de rato, porém seu mecanismo de ação varia de acordo com a linhagem utilizada como modelo de estudo.

I. INTRODUÇÃO

1.1. *Gliomas*

1.1.1 Características e epidemiologia

Gliomas são tumores heterogêneos e altamente invasivos, cujas características histológicas se assemelham às células gliais, como astrócitos e oligodendrócitos (WEN; KESARI, 2008). Sua origem ainda é incerta, mas há indícios que esses tumores se originam de células precursoras neuronais e da desdiferenciação de células gliais maduras (LOUIS, 2006).

A taxa de incidência mundial dos tumores primários malignos do Sistema Nervoso Central (SNC), em 2012, era de 3.4 por 100.000 habitantes. Esse valor varia de acordo com o país, o gênero e a idade dos pacientes estudados (“GLOBOCAN 2012 v1.0 Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase”, 2012). Os gliomas são tumores primários malignos que correspondem a aproximadamente 80% dos tumores malignos do SNC, representando 31% de todos os tumores na população dos Estados Unidos. O desenvolvimento desse tipo de tumor pode ocorrer em qualquer idade, mas a faixa etária onde há maior incidência é entre 65-84 anos. Os gliomas correspondem a 53% de todos os tumores que acometem crianças de 0 a 14 anos, e 37% dos tumores que acometem adolescentes de 15 a 19 anos. Além disso, a taxa de incidência de gliomas é maior em homens (7,16 por 100.000 habitantes) em relação às mulheres (5,06 por 100.000 habitantes). (DOLECEK et al., 2012).

1.1.2 Classificação

Os tumores gliais podem ser classificados em três grupos, considerando as suas características histológicas: Astrocitomas, Oligodendrogliomas e Ependimomas. Os Astrocitomas se assemelham a astrócitos e são categorizados como infiltrativos e não infiltrativos, sendo os tumores infiltrativos os menos diferenciados e, geralmente, com o pior prognóstico. Os Oligodendrogliomas se assemelham com oligodendrócitos e são tumores que crescem num ritmo lento, sendo mais frequentes em adultos jovens. Os Ependimomas são mais facilmente curáveis quando comparados aos demais tumores (CDC CANCER, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO), os tumores do SNC também podem ser classificados em quatro graus. Essa classificação considera os critérios como morfologia celular e nuclear, índice mitótico, taxa proliferativa, perfil histológico e, principalmente, o grau de agressividade do tumor. Os tumores de **grau I** tem uma baixa taxa de

proliferação, não são malignos e apresentam um alto potencial de cura após a ressecção cirúrgica. Os tumores de **grau II** podem ser malignos ou não-malignos e apresentam baixa taxa proliferativa. Eles podem apresentar recorrência, após o tratamento, como tumores de alto grau de agressividade, como, por exemplo, os astrocitomas difusos, que recorrem como astrocitoma anaplásico ou glioblastoma (grau IV). Os tumores de **grau III**, por sua vez, são malignos e geralmente recorrem como tumores de maior grau. Neste tipo de tumor é clara a presença de atipia nuclear e rápida atividade mitótica. Os tumores cerebrais de **grau IV** são os mais agressivos, possuem uma alta taxa proliferativa, são mitoticamente ativos e apresentam zonas necróticas. Esses tumores são associados a um péssimo prognóstico, mesmo após intervenção cirúrgica e quimioterápica (CDC CANCER, 2003; LOUIS et al., 2007).

1.1.3 Glioblastoma

Glioblastomas são gliomas de grau IV do grupo dos astrocitomas (LOUIS et al., 2007) que correspondem a 69% dos tumores gliais, sendo o tipo de tumor mais frequente e maligno de todas as neoplasias primárias malignas do SNC (OHGAKI; KLEIHUES, 2005a). O tempo médio de sobrevivência dos pacientes após o diagnóstico desse tipo de tumor é em torno de 7 meses e a parcela de pacientes que sobrevive após o tempo médio passa de 28-18%, no primeiro ano, a menos de 3% após 5 anos do diagnóstico. Além disso, o tempo de sobrevida é influenciado pela idade dos pacientes, sendo que pacientes jovens (<50 anos) têm média de sobrevida de 8 meses, a qual vai diminuindo conforme aumenta a idade (aproximadamente 4 meses em pacientes com >50 anos) (OHGAKI; KLEIHUES, 2005b; OHGAKI et al., 2004).

Os glioblastomas podem ser divididos nos subtipos primário e secundário. Os primários representam 90% dos glioblastomas e são tumores que se desenvolvem diretamente a glioblastoma, sem passar por estágios precursores de menor grau. Esse subtipo é caracterizado, principalmente, por possuir alta frequência de amplificações nos genes do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutações nos genes da fosfatase e tensina homóloga (PTEN) e perda do cromossomo 10. Os glioblastomas secundários, por sua vez, são tumores malignos que se desenvolvem a partir de precursores de menor malignidade, como astrocitomas de grau II e III. As alterações genéticas encontradas com mais frequências são mutações nos genes da isocitrato desidrogenase (IDH) e no gene da proteína tumoral 53 (TP53), além de perda do braço q do cromossomo 19 e entre outras anomalias genéticas. A idade média dos pacientes com diagnóstico clínico de glioblastoma primário é de 65 anos, enquanto a de pacientes com glioblastoma secundário é de 45 anos, sendo que o tempo médio de sobrevida é em torno de 4,7

e 7,8 meses, respectivamente. Logo, os glioblastomas secundários apresentam melhor prognóstico em relação aos glioblastomas primários (OHGAKI; KLEIHUES, 2013; OHGAKI et al., 2004; WEN; KESARI, 2008; WILSON; KARAJANNIS; HARTER, 2014).

Por serem tumores muito heterogêneos, os glioblastomas são classificados, além de primários e secundários, nos subtipos proneural, neural, mesenquimal e clássico devido ao distinto padrão de expressão genética entre eles (VERHAAK et al., 2010). Além disso, também é possível presenciar essa heterogeneidade entre as células do próprio tumor (PATEL et al., 2014), o que dificulta a ação de terapias específicas para combater a neoplasia.

A opção padrão de tratamento para os glioblastomas constituem a ressecção cirúrgica máxima do tumor, seguida por radioterapia e quimioterapia. A ressecção cirúrgica sozinha mantém a sobrevida média dos pacientes em 6 meses. Porém, quando combinada com radioterapia e quimioterapia, ela é capaz de aumentar a sobrevivência média em aproximadamente 14 meses (WEN; KESARI, 2008; WILSON; KARAJANNIS; HARTER, 2014).

A Temozolomida (TMZ) é o quimioterápico padrão para o tratamento desse tipo de tumor. É um agente alquilante que adiciona grupos metil nas bases purinas, o que causa dano no DNA, induzindo apoptose nas células tumorais. Entretanto, um aumento da expressão da O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (MGMT), enzima que remove o grupo metil da O⁶-metilguanina, impedindo o dano no DNA pela metilação da O⁶-metilguanina, o principal alvo do TMZ. Dessa forma, os glioblastomas que possuem um aumento na expressão de MGMT são resistentes ao agente quimioterápico, o que dificulta ainda mais o tratamento (OMURO; DEANGELIS, 2013; WILSON; KARAJANNIS; HARTER, 2014). A alta heterogeneidade das células tumorais e os mecanismos de resistências a quimioterápicos desenvolvidos pelos glioblastomas levam à necessidade de desenvolver terapias alternativas e até mesmo novos fármacos para combater esse tipo de neoplasia maligna.

1.2. Líquidos iônicos imidazólicos

Desde o início do século 21, os líquidos iônicos apresentam uma vasta aplicação nos mais variados processos industriais devido a sua classificação como “Green Chemistry”, que são produtos químicos e processos que substituem o uso de substâncias perigosas (PLECHKOVA; SEDDON, 2008; ROGERS; SEDDON, 2003). Líquidos iônicos são sais cujo ponto de fusão encontra-se abaixo de 100°C. Seu vasto uso na indústria é devido a características como, por

exemplo, excelente estabilidade química e termal, baixa viscosidade, baixa pressão de vapor, entre outros (BRAUNSTEIN, 1971).

Os líquidos iônicos imidazólicos ou sais imidazólicos são um tipo de líquido iônico que possui um anel imidazólico, o que lhes confere a capacidade de interagir eletrostaticamente com sistemas biológicos (ANDERSON; LONG, 2010). Esses sais são sintetizados a partir da alquilação do imidazol, formando um par de ânion e cátion discretos. Isso confere um design flexível a esses compostos, possibilitando a modelagem das suas propriedades químicas, físicas e biológicas, sendo uma característica de grande interesse para indústrias farmacêuticas para a produção de ingredientes farmacêuticos ativos (IFA) (HOUGH et al., 2007). Sua flexibilidade permite realizar melhoramentos, a fim de ter uma melhor estabilidade, absorção, biodisponibilidade, solubilidade (ex. compostos hidrofóbico ou hidrofílicos), distribuição e permeabilidade, e também desenhar compostos específicos que eliminem o efeito do polimorfismo genético (STOIMENOVSKI et al., 2010).

Vários estudos já mostraram o efeito dos líquidos iônicos em diversos sistemas biológicos, principalmente atividades antibacterianas e antifúngica (DEMBERELNYAMBA et al., 2004; FRADE; AFONSO, 2010; SCHREKKER et al., 2013). Entretanto, poucos trabalhos descrevem a toxicidade dos líquidos iônicos imidazólicos em outras células eucarióticas. Estudos com diferentes linhagens de células tumorais, dentre eles tumores do SNC, reportaram a atividade antitumoral de vários líquidos iônicos imidazólicos, apresentando um amplo espectro de citotoxicidade dependente de concentração e estrutura do composto, sendo que alguns compostos apresentaram alta atividade em baixas concentrações (KAUSHIK et al., 2012; MALHOTRA; KUMAR, 2010). Kaushik *et. al.* (2012) mostrou que líquidos iônicos imidazólicos reduzem a viabilidade de células tumorais (células da linhagem T98 de glioblastoma multiforme) e em células não tumorais (linhagem HEK 293). Entretanto, os líquidos iônicos imidazólicos tiveram menos efeito citotóxico nas células HEK 293 em relação às células tumorais nas mesmas concentrações. Um resultado interessante do ponto de vista terapêutico foi obtido por Schrekker *et. al.* (2013). Ao descrever a atividade antifúngica dos sais imidazólicos, os autores demonstraram que os sais iônicos não causam danos ao DNA de leucócitos humanos nas concentrações de 10 a 65 µg/mL, indicando a ausência de efeito genotóxico dos sais imidazólicos em concentrações acima das que tiveram atividade antifúngica.

II. OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

Tendo como base o efeito citotóxico dos líquidos iônicos imidazólicos em diferentes linhagens tumorais, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral de líquidos iônicos imidazólicos em linhagens de glioblastoma humano e glioma de rato.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar o efeito citotóxico ou antiproliferativo nas linhagens de glioblastoma humano (U87-MG, U138 e M059J) e glioma de rato (C6) dos seguintes sais imidazólicos: C₄MImCl, C₁₀MImCl, C₁₆MImCL, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂, C₁₈MImCl, (C₁₀)₂MImCl, calculando a concentração inibitória média de cada sal sobre cada linhagem.
- Avaliar possíveis alterações no ciclo celular causada pelos sais imidazólicos nas linhagens de glioblastoma humano e glioma de rato.

III. Artigo Científico

Carta de submissão no formato requerido para o periódico “Cancer Letters” (<http://www.journals.elsevier.com/cancer-letters/>).

Chairini C. Thomé¹, Mery S. L. Pereira², Diogo L. de Oliveira³

¹ chairini.thome@gmail.com

² meryzinhaufgrs@gmail.com

³ losch@ufrgs.com.br

Líquidos iônicos imidazólicos apresentam atividade antitumoral em linhagens de glioblastoma humano e glioma de rato

Chairini Cássia Thomé^{1*}, Mery Stéfani Leivas Pereira¹, Diogo Losch de Oliveira^{1*}

¹Laboratório de Neurociência Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

* Endereço para correspondência:

Charini Cássia Thomé

Departamento de Bioquímica, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo

Porto Alegre, RS, Brasil

CEP: 90035-003

E-mail: chairini.thome@gmail.com

Destaques:

Líquidos iônicos imidazólicos diminuem a viabilidade e quantidade de células em linhagens de glioblastoma e glioma.

Líquidos iônicos imidazólicos têm efeito antiproliferativo nas linhagens C6 e U87-MG.

Líquidos iônicos imidazólicos não causam alterações no ciclo celular das células linhagem M059J.

Líquidos iônicos imidazólicos aumentam a porcentagem de células na fase G2, após tratamento, na linhagem U138.

3.1 Resumo

Glioblastomas são tumores primários malignos do SNC. Estes tumores são altamente invasivos e resistentes à quimioterapia, o que faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visem o aumento da sobrevivência do paciente. Os líquidos iônicos imidazólicos são sais com um anel imidazólico que possuem alta estabilidade química e design flexível. Alguns sais imidazólicos já foram descritos pela sua atividade antitumoral, porém seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral dos sais imidazólicos (C_4MImCl , $C_{10}MImCl$, $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$, $C_{16}MImNTf_2$, $C_{18}MImCl$, $(C_{10})_2MImCl$) nas linhagens de glioma C6 e glioblastoma M059J, U138 e U87-MG e elucidar seu mecanismo de ação. Nos ensaios SRB e MTT observamos uma diminuição na quantidade e viabilidade das células, respectivamente, e alterações morfológicas após 24h de tratamento. Os sais, com exceção do C_4MImCl e $C_{10}MImCl$, apresentaram CE_{50} entre 0,85 a 7,4 nM. Análises do ciclo celular demonstraram que os sais induzem parada no ciclo celular nas linhagens C6 e U87-MG e deslocamento das células da fase G1 para G2 na linhagem U138. Na linhagem M059J os compostos não causam alterações no ciclo celular.

Palavras chave: glioblastoma, glioma, líquidos iônicos imidazólicos, atividade antitumoral, ciclo celular, atividade antiproliferativa.

3.2 Introdução

Glioblastomas são os tumores primários malignos mais frequentes e letais do Sistema Nervoso Central (SNC), representando 69% dos tumores gliais (OHGAKI; KLEIHUES, 2005a). Classificados como glioma de grau IV pela Organização Mundial da Saúde, os glioblastomas são caracterizados pela sua heterogeneidade, alta invasibilidade e taxa de proliferação, além de sua semelhança histológica com células gliais (LOUIS et al., 2007). O tempo médio de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com esse tipo de tumor é de aproximadamente 7 meses, diminuindo progressivamente à medida que aumenta a idade do paciente (OHGAKI; KLEIHUES, 2005b). A ressecção cirúrgica do tumor, seguida da radioterapia e quimioterapia com Temozolomida (TMZ) constituem o tratamento padrão para esse tipo de neoplasia maligna, entretanto a sobrevida média dos pacientes só é estendida até 14 meses após o tratamento (WILSON; KARAJANNIS; HARTE, 2014). Devido à sua alta heterogeneidade e desenvolvimento de mecanismos de resistência a quimioterápicos (MARUMOTO; SAYA, 2012), existe uma crescente necessidade de desenvolver novos fármacos e terapias alternativas para combater esse tipo de neoplasia maligna.

Devido às suas propriedades físico-químicas e seu design flexível, os líquidos iônicos imidazólicos vêm sendo utilizados pela comunidade científica para o desenvolvimento de novos fármacos. Os líquidos iônicos imidazólicos, ou sais imidazólicos, são um tipo de líquido iônico que apresenta características como baixo ponto de fusão, alta estabilidade química, estabilidade em altas temperaturas, baixa viscosidade, entre outras (BRAUNSTEIN, 1971). Os sais imidazólicos são compostos sintéticos que possuem um anel imidazólico e são sintetizados a partir da alquilação desse anel, formando ânions e cátions discretos. Seu design flexível permite modelar propriedades químicas, físicas e biológicas a fim de melhorar a estabilidade, permeabilidade, solubilidade e absorção, entre outras características dos sais, para a produção de ingredientes farmacêuticos ativos (HOUGH et al., 2007; STOIMENOVSKI et al., 2010).

Diversos trabalhos têm avaliado a atividade antibacteriana e antifúngica dos sais imidazólicos (DEMBERELNYAMBA et al., 2004; FRADE; AFONSO, 2010; SCHREKKER et al., 2013). Além disso, Malhotra e Kumar (2010) avaliaram *in vitro* a atividade antitumoral dos sais imidazólicos em 60 linhagens tumorais de diferentes tipos de câncer. Neste estudo, foi analisado o efeito antitumoral dos líquidos iônicos imidazólicos, o qual é dependente do tipo de linhagem e composto estudado, sendo que em linhagens de glioblastoma, o efeito antitumoral observado foi em concentrações micromolares (MALHOTRA; KUMAR, 2010). Em especial, Kaushik *et*.

al. (2012) mostraram que sais imidazólicos também apresentam atividade antitumoral em linhagem de glioblastoma humano, sendo que o efeito tóxico foi visto tanto na linhagem tumoral quanto na linhagem de células não-tumorais. Entretanto, a citotoxicidade foi menor nas células não-tumorais nas mesmas concentrações (KAUSHIK et al., 2012).

Com base no descrito acima, o objetivo deste trabalho foi analisar a possível atividade antitumoral dos sais imidazólicos (C₄MImCl, C₁₀MImCl, C₁₆MImCL, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂, C₁₈MImCl e (C₁₀)₂MImCl) em linhagens de glioblastoma humano e de glioma de rato.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Materiais

Os reagentes Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Soro Fetal Bovino (SFB), solução de tripsina 0,05%, Penicilina/estreptomicina e Fungizona foram obtidos da Gibco®. Os reagentes {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-difeniltetrazolio]} (MTT), Sulforodamina B (SRB) e Dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da Sigma®. As placas de cultivo da TPP®. O Iodeto de Propídio (IP) foi obtido da BD Bioscience®. A Ribonuclease (RNase) foi obtida da Invitrogen®.

3.3.2 Cultivo celular

As linhagens de glioblastoma humano M059J, U87-MG e U138 e a linhagem de glioma de rato C6, foram obtidas da ATCC® (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EUA). Estas células, entre 8 e 40 passagens, foram cultivadas em meios DMEM contendo 0,5 U/mL de penicilina, 0,25 mg/mL de fungizona e suplementados com 10% e 5% de SFB, respectivamente. Durante o cultivo, as células foram incubadas em estufa de 95:5 O₂/CO₂ a 37°C.

3.3.3 Preparação dos compostos e tratamentos

Os líquidos iônicos imidazólicos C₄MImCl (1-*n*-butyl-3-methylimidazolium chloride), C₁₀MImCl (1-*n*-Decyl-3-methylimidazolium chloride), C₁₆MImCL (1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride), C₁₆MImMeS (1-*n*-Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate), C₁₆MImNTf₂ (1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethyl)sulfonylimide), C₁₈MImCl (1-*n*-Octadecyl-3-methylimidazolium chloride) e

(C₁₀)₂MImCl (1,3-di-*n*-decyl-2-methylimidazolium chloride), sintetizados como citado por Schrekker *et al.* (2013) (Fig. 1) foram diluídos em DMSO 100% em concentrações de 1.200 mg/mL ou 300 mg/mL, obtendo-se uma concentração final máxima de DMSO 1% por poço durante os tratamentos. As concentrações testadas por um período de tempo de 24 horas nos ensaios de viabilidade e quantificação celular foram de 0,125 µg/mL a 6,0 µg/mL. Foram utilizados dois controles, um contendo somente o meio de cultivo e o outro contendo o veículo (DMSO 1% em meio de cultivo). Os tratamentos foram realizados 24 horas após as células serem semeadas.

3.3.4 Ensaio Viabilidade Celular

A viabilidade das células foi avaliada pela técnica do MTT. Neste ensaio, o sal tetrazólico MTT é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas formando um pigmento violeta, o formazan, que se acumula nas células em forma de cristais (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram semeadas em placas de 96 poços nas quantidades de 8×10^3 células/poço para as linhagens C6 e U87-MG e 6×10^3 células/poço para as linhagens U138 e M059J. Vinte e quatro horas após o período de tratamento, elas foram lavadas com Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS) e incubadas com 100 µL de MTT 0,5 mg/mL por 1h sobre placa de aquecimento a 37°C e protegidas da luz. Após o período de incubação, os cristais violetas formados foram solubilizados com DMSO, sob agitação por 30 min, e, após, foi feita a leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 560 e 650 nm. Foram realizados 5 experimentos independentes (n=5) em triplicata.

3.3.5 Ensaio de Quantificação Celular

A marcação com SRB foi utilizada como técnica complementar ao ensaio de viabilidade celular, para mensurar a quantidade de células após os tratamentos. O SRB é um corante rosa que, em meio moderadamente ácido, se liga na porção básica dos aminoácidos e se dissocia dos mesmos em meio básico (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). A quantidade de corante extraído é proporcional à quantidade total de proteína presente no poço, possibilitando o cálculo do número de células aderidas.

As células foram fixadas por 1h com Ácido tricloroacético (TCA) 10% a 4°C. Após as placas foram lavadas com água destilada e deixadas secando à temperatura ambiente. Depois, as células foram encubadas por 15 min em solução de SRB 0,2% diluída em Ácido Acético 1%,

lavadas com Ácido Acético 1% e incubadas com TRIS 10 mM pH 10,5 por 30 min sob agitação para posterior leitura da absorbância a 490 nm.

Para poder calcular o número de células, foi feita uma curva de densidade de células (Fig.2), na qual foi possível correlacionar os valores obtidos na absorbância do SRB a 490 nm com a quantidade de células semeadas em cada poço. Para isso, foram plaqueadas diferentes densidades de células (de 1.000 a 100.000 células por poço) e 2h após foi realizada a técnica do SRB, como descrito acima.

Tanto para a curva de densidade de células, como para o ensaio de crescimento celular, foram realizados 5 experimentos independentes (n=5).

3.3.6 Ciclo Celular

As análises das fases do ciclo celular foram realizadas com o citômetro BD Accuri™ C6. As células foram semeadas em placas de 6 poços nas quantidades 2×10^5 células/poço (linhagens U87-MG e C6) e $1,5 \times 10^5$ células (linhagens M059J e U138) e tratadas com as concentrações efetivas médias (CE_{50}), obtidas no ensaio do MTT, de cada composto nas respectivas linhagens. Após o tratamento (24h), elas foram tripsinizadas, centrifugadas, fixadas com álcool 70%, incubadas por 30 min com a solução PSSI (RNAse 0,12 mg/mL, IP 0,012 mg/mL, Triton X-100 0,0014% e PBS 0,3 M) e, após, feita a leitura da fluorescência no citômetro de fluxo. Os dados obtidos foram analisados com o programa FCS 5 Express Plus Citometry (DeNovo Software™). Foram realizados 3 experimentos independentes (n=3).

3.3.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Os resultados do ciclo celular foram analisados estatisticamente por Análise da Variância (ANOVA) de 2 vias, seguidos do teste de Bonferoni. O CE_{50} foi calculado usando o programa GraphPad Prism 6. $P < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância.

3.4 Resultados

3.4.1 Ensaio da Viabilidade Celular e da Quantificação Celular

Os testes de viabilidade celular e quantificação celular foram realizados para analisar o efeito dos sais imidazólicos sobre as linhagens C6, M059J, U138 e U87-MG (Fig. 3). Em todas as

linhagens analisadas observou-se uma diminuição dependente da concentração na porcentagem de células viáveis e na porcentagem de células aderidas, em relação ao grupo veículo (DMSO 1%), somente após os tratamentos com os compostos C₁₀MImCl, C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂, C₁₈MImCl e (C₁₀)₂MImCl em todas as linhagens analisadas. O composto C₄MImCl não alterou o número de células e a quantidade de células viáveis quando comparado ao tratamento com o veículo (DMEM + DMSO 1%). Não houve diferença na viabilidade e na porcentagem de células aderidas entre o grupo tratado somente com meio de cultivo (DMEM) e o grupo veículo (DMEM + DMSO 1%) (dados não mostrados).

As concentrações dos sais imidazólicos que apresentaram um efeito de diminuir a quantidade de células viáveis e a quantidade total de células em 50% (CE₅₀) 24h após o tratamento estão indicadas na Tabela 1. Não foi possível calcular o CE₅₀ do composto C₄MImCl com as concentrações testadas, visto que os tratamentos não alteraram a quantidade de células aderidas no poço e a viabilidade celular. Para o composto C₁₀MImCl, só foi possível calcular o CE₅₀ na linhagem C6, visto que nas demais linhagens não houve diferenças na viabilidade e quantidade de células em relação ao grupo veículo após o tratamento por 24 horas nas concentrações utilizadas. Aparentemente, o composto mais eficiente em diminuir a viabilidade celular em 50% nas linhagens C6 e U138 foi (C₁₀)₂MImCl (0,86 nM e 2,3 nM; respectivamente), visto que nas linhagens M059J e U87-MG foi aparentemente o composto C₁₆MImMeS (1,2 nM e 2,8 nM; respectivamente). Em relação à diminuição da quantidade de células em 50%, aparentemente, o composto mais eficiente nas linhagens C6, U138 e U87-MG foi o (C₁₀)₂MImCl (1 nM; 4,4 nM e 2,95 nM; respectivamente) e na linhagem M059J foi o composto C₁₆MImMeS (2,45 nM).

3.4.2 Alterações morfológicas

Apesar de não ter sido feita uma análise morfológica profunda, foi possível observar que o tratamento com os líquidos iônicos imidazólicos nas concentrações próximas aos CE₅₀ provocou alterações na forma e no tamanho das células (Fig. 4).

Na linhagem C6, os tratamentos com os sais imidazólicos (Fig. 4E, I, M, Q, U, Y e AC) aparentemente diminuiriam a quantidade e comprimento dos prolongamentos das células, bem como alteram o tamanho celular. As células parecem ter ficado maiores e com aspecto túrgido, em relação ao controle (Fig. 4A). Também foi possível observar a presença de vacúolos no citoplasma e grânulos ao redor do núcleo.

Na linhagem M059J, foi possível ver uma provável diminuição da área das células e a presença de vacúolos após os tratamentos (Fig. 4F, J, N, R, V, Z e AD). Além disso, 24h após os tratamentos, foi possível notar melhor as delimitações das células e uma grande quantidade de células soltas, o que não foi visto no grupo veículo, onde as células estão bem aderidas na placa e próximas umas às outras, sendo difícil delimitar as suas bordas (Fig. 4B).

As células da linhagem U87-MG também apresentaram possíveis alterações morfológicas após os tratamentos como, por exemplo, diminuição ou quase ausência de prolongamentos e presença de vacúolos (Fig. 4G, K, O, S, W, AA e AE), quando comparadas às células do grupo DMSO 1% (Fig. 4C).

Nas células da linhagem U138, pós-tratamento, também foi possível notar uma possível presença de vacúolos no citoplasma, além de uma provável alteração no formato celular, pois as células aparentemente se apresentavam com formato retangular e oval (Fig. 4H, L, P, T, X, AB e AF), ao contrário da morfologia mais fibroblástica aparente nas células do grupo DMSO 1% (Fig. 4D).

3.4.3 Ciclo Celular

Considerando que os sais imidazólicos diminuíram a porcentagem de células viáveis e a quantidade total de células, decidimos investigar se essa diminuição seria resultado de um efeito antiproliferativo desses compostos. Para isso, realizamos a análise do ciclo celular de cada linhagem por citometria de fluxo. As células foram tratadas com concentrações equivalentes ao CE_{50} obtidas no ensaio MTT dos compostos $C_{16}MImCL$, $C_{16}MImMeS$, $C_{16}MImNTf2$, $C_{18}MImCl$ e $(C_{10})_2MImCl$, em sua respectiva linhagem.

Os sais imidazólicos induziram um aumento na porcentagem de células na fase G1, com consequente diminuição na porcentagem de células na fase S e sem alterações na fase G2, nas linhagens C6 (Fig. 5) e U87 (Fig. 6), em relação ao grupo veículo. Na linhagem M059J não foi observada nenhuma alteração na distribuição das células entre as fases do ciclo celular, quando comparada ao grupo veículo (Fig. 7). A linhagem U138 apresentou um perfil distinto das demais linhagens, pois 90,04% das células dessa cultura eram aneuploides e os 9,96% restantes, eram células diploides. Além da maior proporção de células, as células aneuploides pós-tratamentos mostraram um aumento significativo na porcentagem de células na fase G2 e diminuição na porcentagem de células fase G1, sem alterações na fase S, quando comparadas às do grupo controle veículo (Fig. 8).

3.5 Discussão

Em um estudo anterior já havia sido confirmada a atividade antitumoral dos líquidos iônicos C16MImCl e C18MImCl em linhagens de glioblastoma humano, diferentes das usadas neste trabalho, onde os autores constataram uma inibição de crescimento de 50% (ensaio SRB) com concentrações entre 0,3 a 1,2 μ M (MALHOTRA; KUMAR, 2010). No nosso trabalho, observamos que esses e outros sais imidazólicos também apresentam atividade antitumoral em linhagens de glioblastoma humano e de rato, porém em concentrações muito menores do que as já descritas (Tabela. 1). Nos dados do MTT e SRB, a linhagem C6 se mostrou ser a mais sensível aos tratamentos, enquanto as linhagens U138 e U87-MG, foram as mais resistentes, visto que foram necessárias concentrações maiores para reduzir em 50% o número de células viáveis e a quantidade de células no poço (Fig.3).

Nas linhagens M059J e U138 nota-se que as concentrações do CE₅₀ do SRB são maiores do que as CE₅₀ do MTT. Isso pode ser explicado devido a uma peculiaridade na técnica do SRB, na qual o corante também se liga nas proteínas de células que continuam aderidas na placa e que não estão mais viáveis (não sendo detectadas pela técnica do MTT). Portanto, é possível obter valores de SRB de 2 a 3 vezes maiores, dependendo do tipo de célula testada (KEEPERS et al., 1991), explicando os resultados aqui obtidos.

O sal imidazólico que aparentemente se mostrou ser mais eficiente em três das quatro linhagens foi o (C10)₂MImCl, pois apresentou os menores valores de CE₅₀. O efeito citotóxico deste composto pode estar relacionado ao comprimento da cadeia de carbonos, ou seja, quanto maior a cadeia de carbono, mais tóxico é o composto (RANKE et al., 2007). O inverso também é válido, quanto menor a cadeia de carbono do líquido iônico imidazólico, menor é o seu efeito citotóxico (MALHOTRA; KUMAR, 2010), explicando por que os compostos C4MImCl e C10MImCl foram ineficazes nas concentrações testadas (Fig. 3). Entretanto, um estudo apontou o efeito antitumoral do C4MImCl em linhagem de glioblastoma humano, obtendo um IC₅₀ de 90 μ g/mL, uma concentração muito acima da utilizada em nosso trabalho.

A linhagem M059J aparentemente apresentou uma certa resistência ao tratamento com o (C10)₂MImCl, tendo o C16MImMeS se mostrado o composto mais eficiente nessa linhagem e o segundo mais eficiente nas demais linhagens (Tabela 1). Essa característica condiz com o fato de um parâmetro de toxicidade não estar somente relacionado ao comprimento da cadeia carbônica, mas também à citotoxicidade relacionada ao ânion, onde compostos com MeS⁻ são

mais tóxicos que os com Cl⁻ (BICZAK et al., 2014; MATZKE et al., 2007), explicando por que um composto com uma cadeia de carbono mediana pode ser um dos compostos mais efetivo nas linhagens.

A complementação dos nossos experimentos com a análise do ciclo celular mostrou que os sais imidazólicos possivelmente desempenham mecanismos de ação diferentes dependendo do tipo celular. Nas linhagens C6 e U87-MG, os sais imidazólicos C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂, C₁₈MImCl e (C₁₀)₂MImCl induziram uma parada no ciclo celular, diminuindo a porcentagem de células na fase S e aumentando na fase G1 (Fig. 5 e 6). Essa similaridade de efeitos nas linhagens C6 e U87-MG se repetiu, aparentemente, no padrão de alteração morfológica apresentado pelas células após os tratamentos (diminuição dos prolongamentos) (Fig. 4) e também nos dados obtidos no SRB e MTT, onde os valores de CE₅₀ de cada composto em cada técnica foram similares em suas respectivas linhagens (Tabela 1), diferente do perfil obtido com as linhagens M059J e U138.

Não foi observada nenhuma alteração na distribuição das células da linhagem M059J nas fases do ciclo celular quando comparada ao grupo veículo (Fig. 7). Isso é um indicativo de que há a possibilidade dos tratamentos com os sais imidazólicos estarem causando algum tipo de morte celular nesta linhagem, visto que a diminuição no número e viabilidade das células não foram causadas por um efeito antiproliferativo.

Os tratamentos com os CE₅₀ dos sais imidazólicos acarretaram um deslocamento das células da fase G1 para a fase G2, indicando que os tratamentos não induziram um efeito anti-proliferativo. Diferente das demais linhagens, a maioria das células da linhagem U138 apresentou um conteúdo cromossômico aneuploide (Fig. 8). Tumores com células aneuploides geralmente estão associados com um maior grau de malignidade (DEY, 2004). Essa aneuploidia pode ser um indicativo de uma maior malignidade da linhagem U138, o que pode explicar a aparente resistência dessa linhagem ao tratamento com os sais imidazólicos em relação às outras linhagens estudadas (Fig. 3 e Tabela 1).

Há poucos trabalhos mostrando o efeito tóxico dos compostos imidazólicos que foram testados neste trabalho em células não tumorais. Entretanto, um trabalho mostrou a ausência de efeito genotóxico após o tratamento de linfócitos humanos por 1 hora com o composto C₁₆MImCl na concentração 16 µg/mL (SCHREKKER et al., 2013), uma concentração muito acima da obtida no CE₅₀ de todas as linhagens testadas.

Com base nos nossos resultados, podemos concluir que os líquidos iônicos imidazólicos possuem atividade antitumoral em linhagens de glioblastoma humano e gliomas de rato, através de um efeito antiproliferativo

3.6 Referências

BERRIDGE, M. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, n. 4, p. 4–9, 1996.

BICZAK, R. et al. The role of the anion in the toxicity of imidazolium ionic liquids. **Journal of Hazardous Materials**, v. 274, p. 181–190, 2014.

BRAUNSTEIN, J. **Advances in Molten Salts Chemistry**. 1. ed. Plenum Press, New York: Plenum Press, 1971.

DEMBERELNYAMBA, D. et al. Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 853–857, 2004.

DEY, P. Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. **Journal of clinical pathology**, v. 57, n. 12, p. 1245–1249, 2004.

FRADE, R. F. M.; AFONSO, C. A. M. Impact of ionic liquids in environment and humans: An overview. **Human and Experimental Toxicology**, v. 29(12), p. 1038–1054, 2010.

HOUGH, W. L. et al. The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. **New Journal of Chemistry**, v. 31, n. 8, p. 1429, 2007.

KAUSHIK, N. K. et al. Synthesis and antiproliferative activity of ammonium and imidazolium ionic liquids against T98G brain cancer cells. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 13727–13739, 2012.

KEEPERS, Y. P. et al. **Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing.** **European journal of cancer**, 1991.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.

MALHOTRA, S. V.; KUMAR, V. A profile of the in vitro anti-tumor activity of imidazolium-based ionic liquids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 581–585, 2010.

MARUMOTO, T.; SAYA, H. Molecular biology of glioma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 746, p. 2–11, 2012.

MATZKE, M. et al. The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. **Green Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 1198, 2007.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 64, n. 6, p. 479–489, 2005a.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathologica**, v. 109, n. 1, p. 93–108, 2005b.

RANKE, J. et al. Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 3, p. 430–438, 2007.

SCHREKKER, H. S. et al. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. **MedChemComm**, v. 4, n. 11, p. 1457–1460, 2013.

STOIMENOVSKI, J. et al. Crystalline vs. ionic liquid salt forms of active pharmaceutical ingredients: A position paper. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p. 521–526, 2010.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

WILSON, T. A.; KARAJANNIS, M. A.; HARTEK, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. **Surgical neurology international**, v. 5, p. 64, 2014.

3.7 Legendas Figuras

Figura 1. Estrutura química dos líquidos iônicos imidazólicos ou sais imidazólicos testados para avaliar a atividade antitumoral. Esses compostos possuem um ânion e um cátion.

Figura 2. Curva de concentração celular para ensaio de quantificação celular. Gráfico expressa a absorvância (λ) e o número de células multiplicado por mil ($\times 10^3$).

Figura 3. Resultados dos ensaios de viabilidade celular (MTT) e quantificação celular (SRB) nas linhagens C6, MJ059, U138 e U87-MG após tratamento com sais imidazólicos.

Ensaio MTT e SRB após 24 horas de tratamento com os compostos C4MImCl (A), C10MImCl (B), C16MImCl (C), C16MImMeS (D), C16MImNTf2 (E), C18MImCl (F) e (C10)₂MImCl (G) nas linhagens C6 (azul), U87-MG (vermelho), U138 (verde) e M059J (roxo). O grupo veículo (DMSO 1%) está representado no gráfico como a concentração 0.0 mg/mL. n= 5.

Figura 4. Morfologia das células tratadas com os sais imidazólicos nas concentrações próximas do CE₅₀ (MTT 24h). Escala 100 μ m.

Figura 5. Avaliação dos efeitos no ciclo celular na linhagem C6 após tratamento com sais imidazólicos por 24h. *P>0,05 e ***P>0,001, quando comparados ao grupo veículo (DMSO 1%) (Anova 2 vias, seguida por teste de Bonferroni). n=3.

Figura 6. Avaliação dos efeitos no ciclo celular na linhagem U87-MG após tratamento com sais imidazólicos por 24h. **P>0,01 e ***P>0,001, quando comparados ao grupo veículo (DMSO 1%) (Anova 2 vias, seguida por teste de Bonferroni). n=3.

Figura 7. Avaliação dos efeitos no ciclo celular na linhagem M059J após tratamento com sais imidazólicos por 24h. Não houve resultados significativos, quando comparados ao grupo veículo (DMSO 1%). n=3.

Figura 8. Avaliação dos efeitos no ciclo celular na linhagem U138 após tratamento com sais imidazólicos por 24h. **P>0,01 e ***P>0,001, quando comparados ao grupo veículo (DMSO 1%) (Anova 2 vias, seguida por teste de Bonferroni). n=3.

3.8 Figuras

Figura 1.

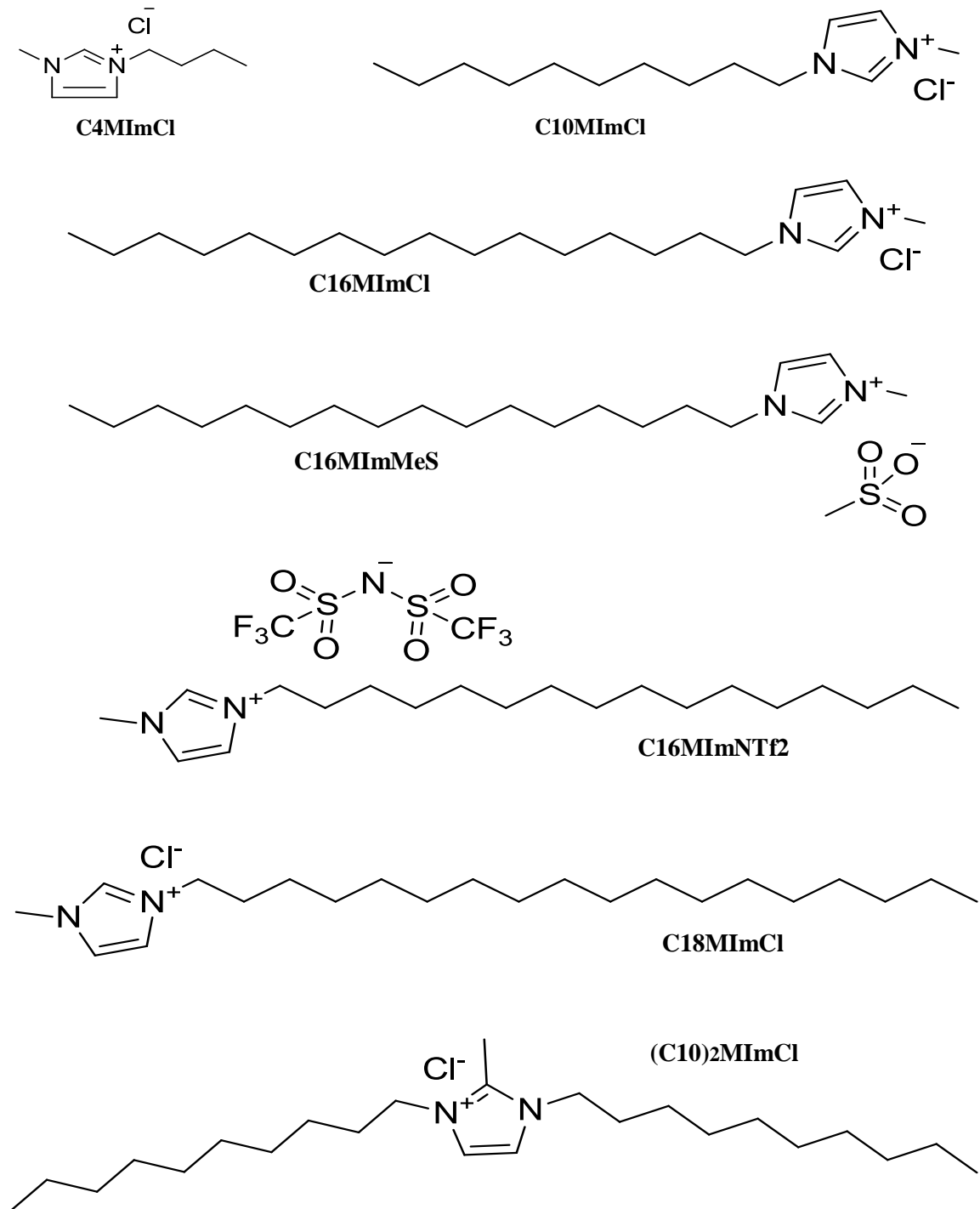


Figura 2.

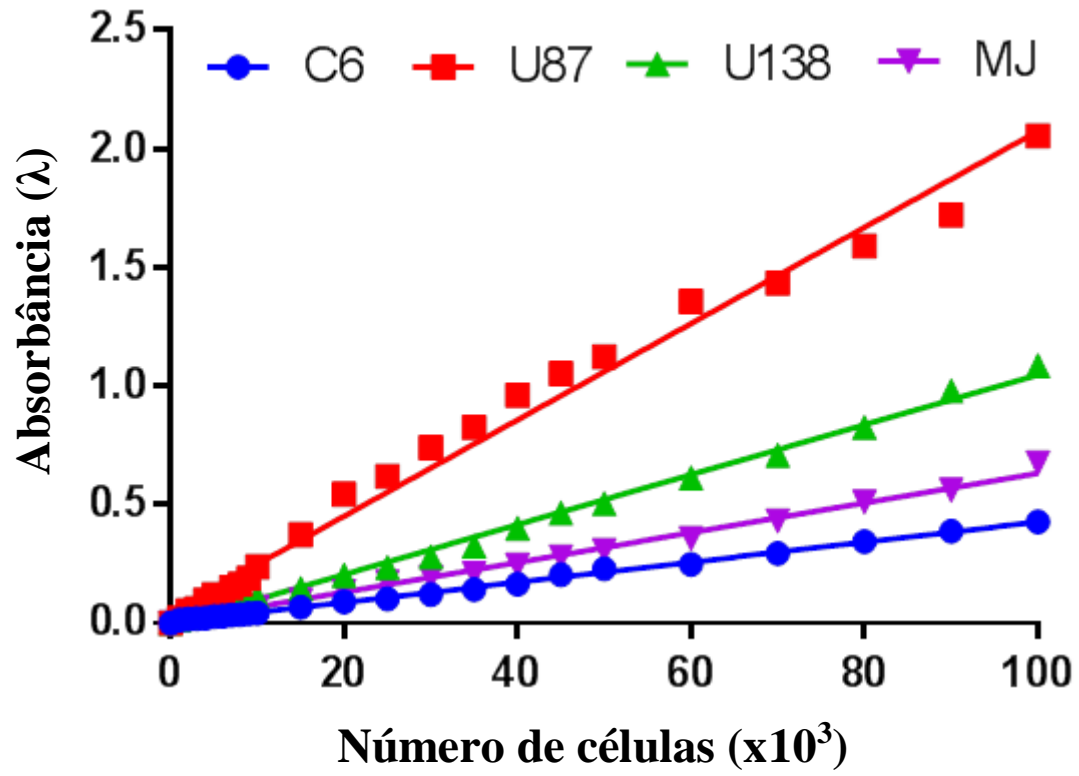


Tabela 1. Valor do CE₅₀ (µg/mL) dos sais imidazólicos calculado a partir do resultado dos ensaios MTT e SRB 24h.

Linhagem/ Composto	C6		M059J		U138		U87-MG	
	CE ₅₀ SRB**	CE ₅₀ MTT**	CE ₅₀ SRB**	CE ₅₀ MTT**	CE ₅₀ SRB**	CE ₅₀ MTT**	CE ₅₀ SRB**	CE ₅₀ MTT**
C4MImCl	>6 (34,4 nM)	>6 (34,4 nM)	>6 (34,4 nM)	>6 (34,4 nM)	>6 (34,4 nM)	>6 (34,4 nM)	>6 (34,4 nM)	>6 (34,4 nM)
C10MImCl	>6 (23,2 nM)	5,16 (19,9 nM)	>6 (23,2 nM)	>6 (23,2 nM)	>6 (23,2 nM)	>6 (23,2 nM)	>6 (23,2 nM)	>6 (23,2 nM)
C16MImCl	0,54 (1,6 nM)	0,54 (1,6 nM)	1,0 (2,9 nM)	0,46 (1,35 nM)	2,11 (6,15 nM)	1,17 (3,4 nM)	1,48 (4,3 nM)	1,09 (3,2 nM)
C16MImMeS	0,46 (1,15 nM)	0,49 (1,2 nM)	0,99 (2,45 nM)*	0,49 (1,2 nM)*	2,40 (5,95 nM)	1,26 (3,1 nM)	1,48 (3,7 nM)	1,12 (2,8 nM)*
C16MImNTf2	1,17 (1,98 nM)	1,18 (2,0 nM)	3,4 (5,2 nM)	1,25 (2,1 nM)	3,58 (6,1 nM)	2,19 (3,7 nM)	2,86 (4,9 nM)	2,86 (4,9 nM)
C18MImCl	0,70 (1,9 nM)	0,75 (2,0 nM)	1,33 (3,6 nM)	0,83 (2,2 nM)	2,73 (7,4 nM)	1,44 (3,9 nM)	1,68 (4,55 nM)	1,66 (4,5 nM)
(C10)₂MImCl	0,40 (1 nM)*	0,34 (0,86 nM)*	1,35 (3,4 nM)	0,97 (2,4 nM)	1,72 (4,4 nM)*	0,92 (2,3 nM)*	1,17 (2,95 nM)*	1,18 (3,0 nM)

*concentração mais efetiva na linhagem.

**o valor do CE50 foi calculado com o programa GraphPad Prism 6.

Figura 3.

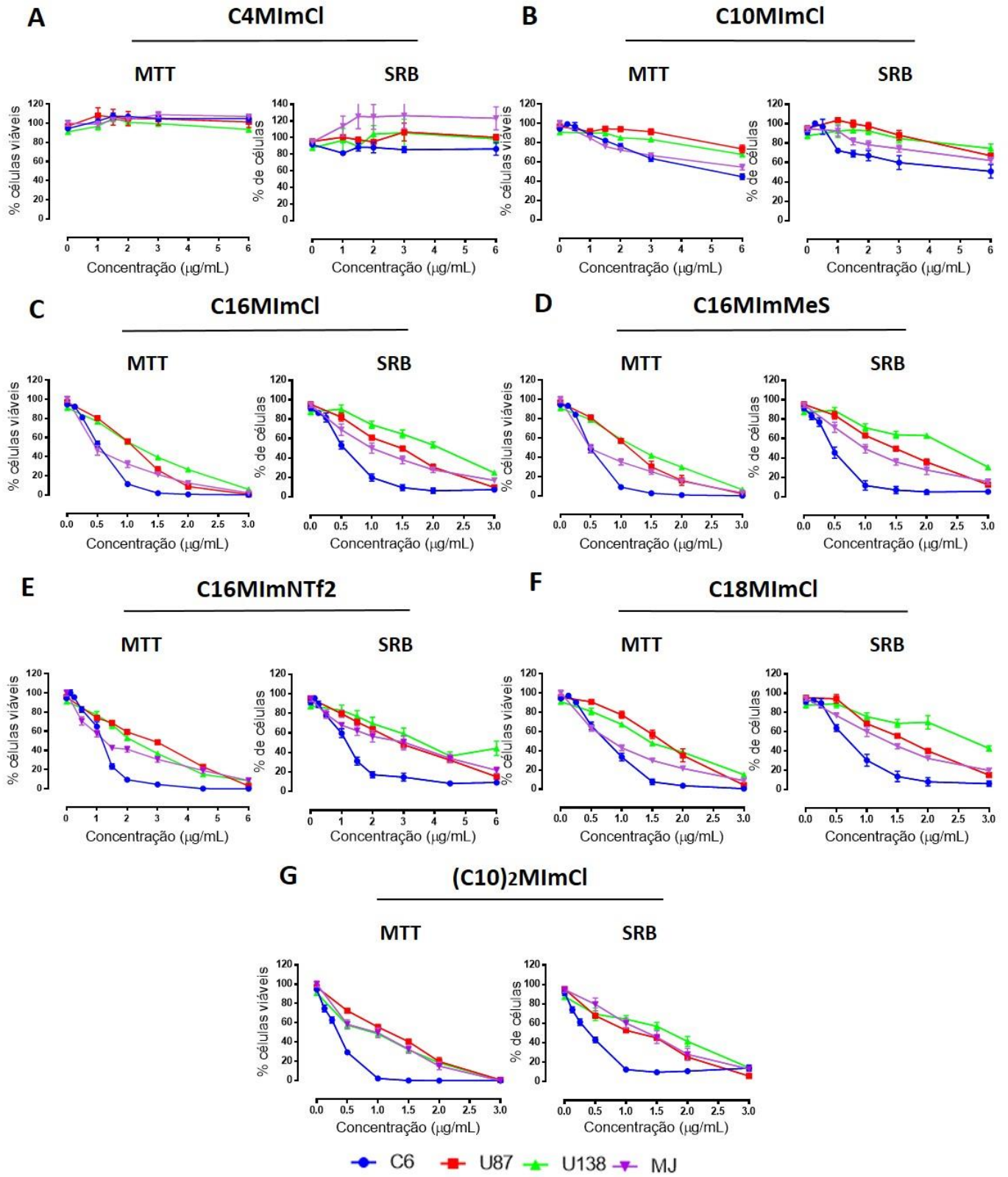


Figura 4

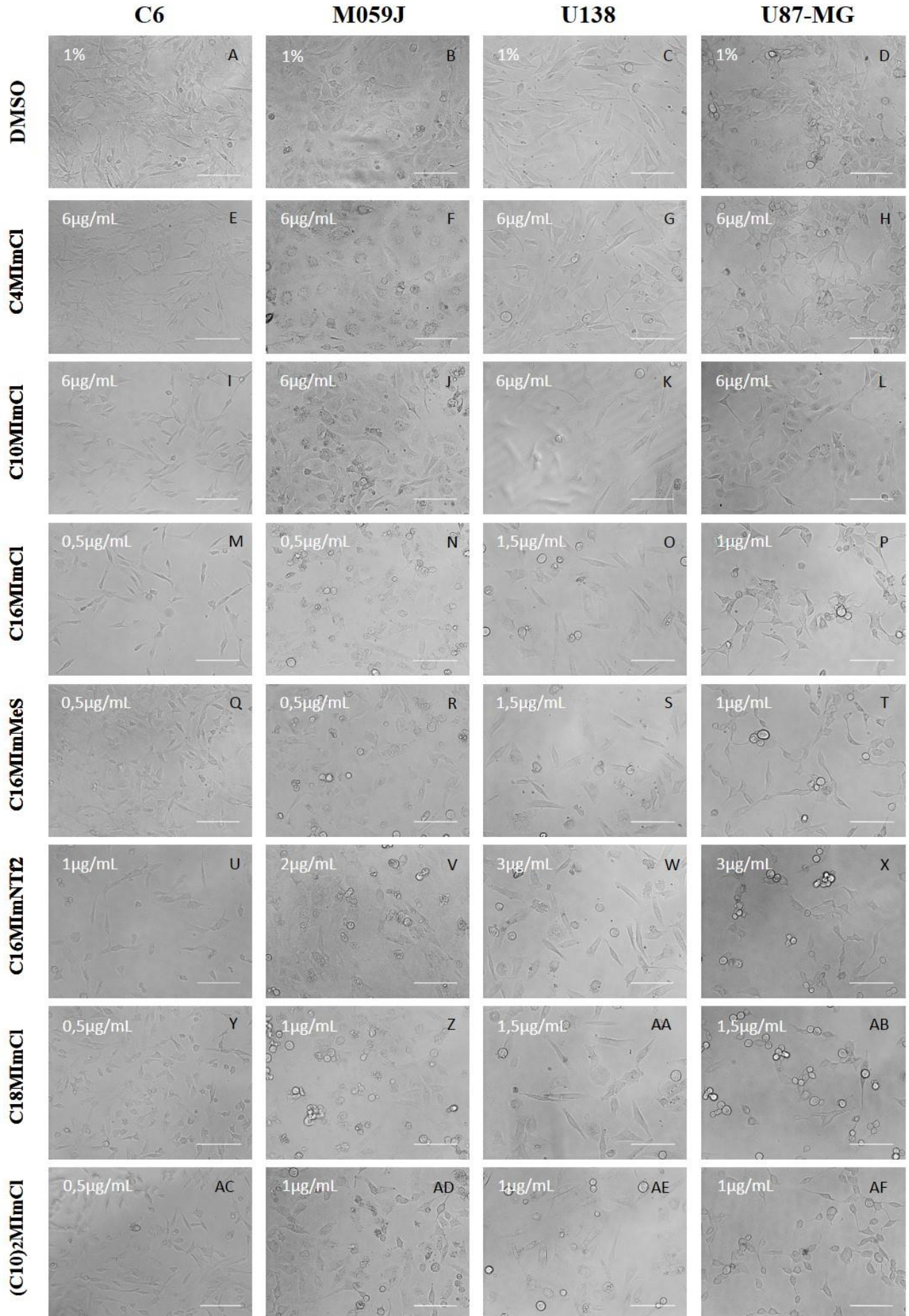


Figura 5.

C6

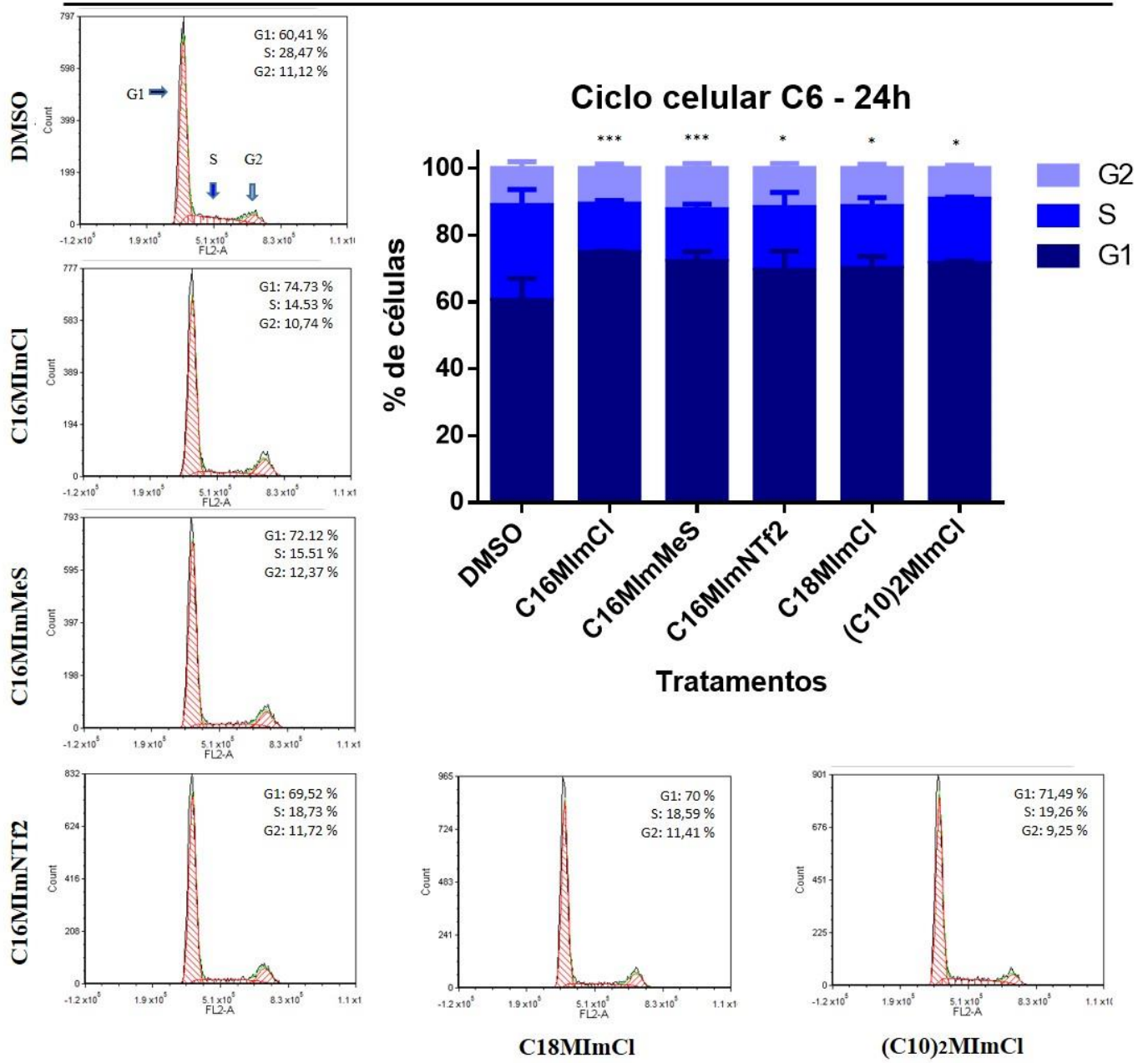


Figura 6.

U87 - MG

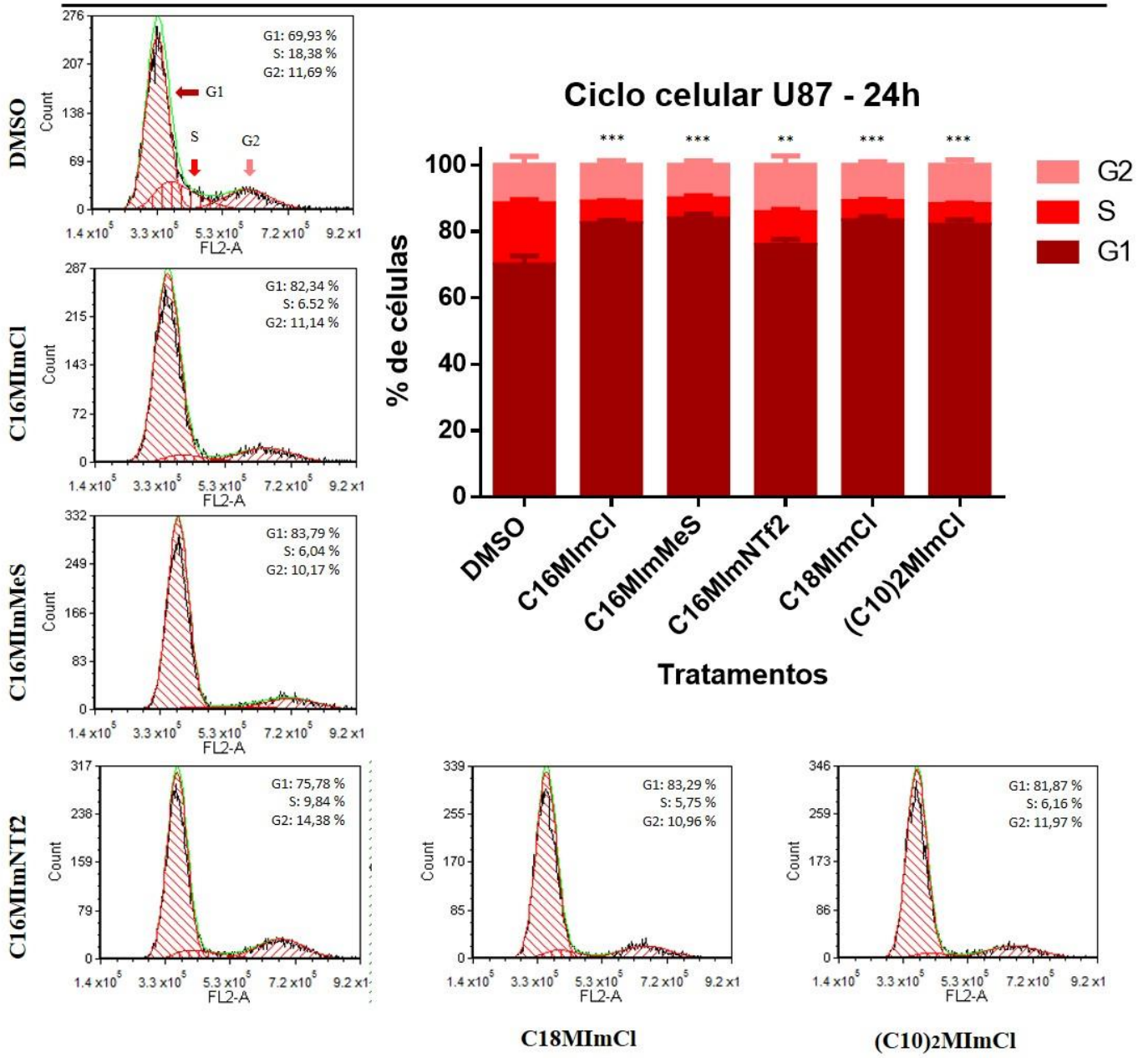


Figura 7.

M059J

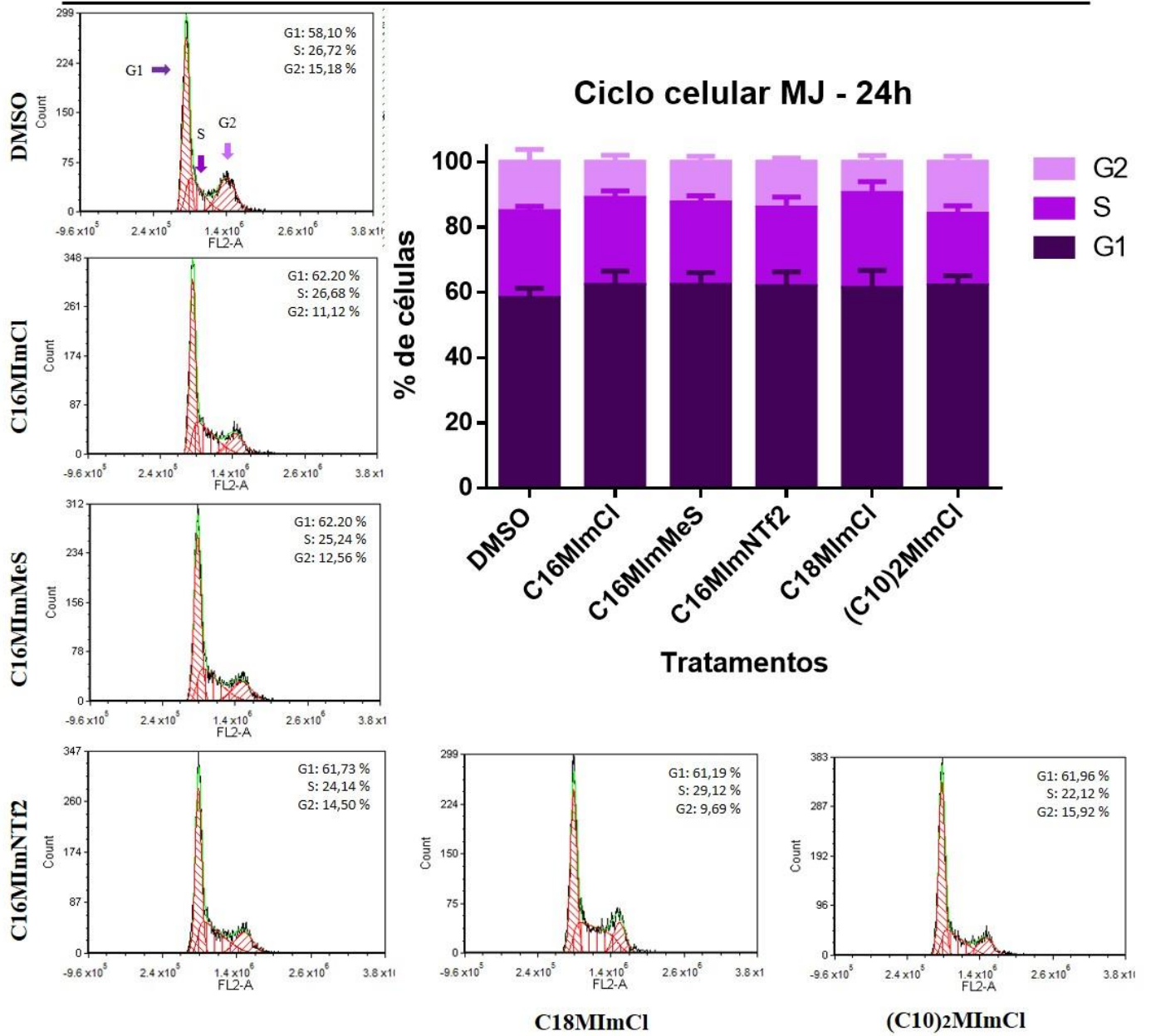
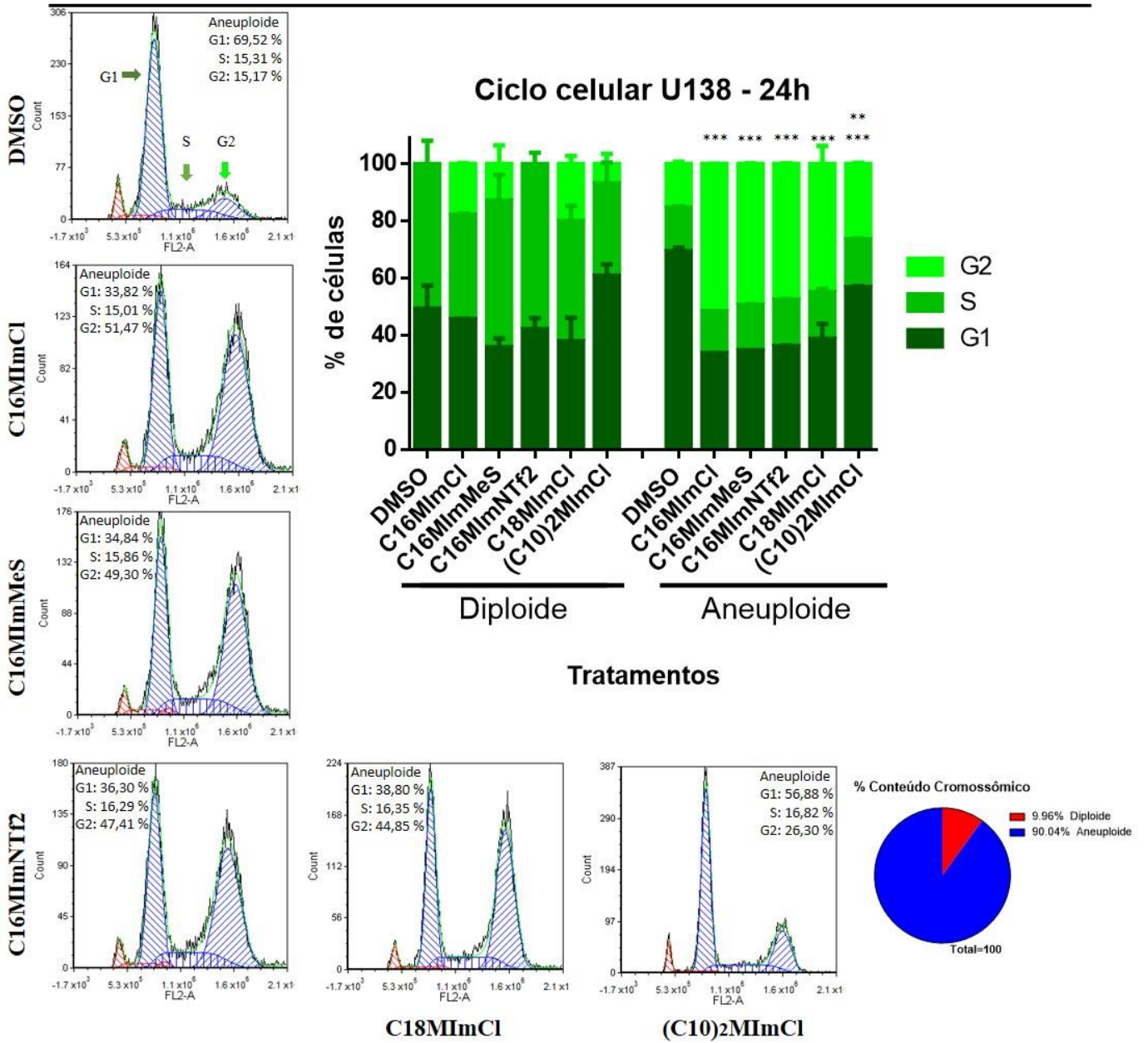


Figura 8.

U138



IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Trabalhos anteriores já haviam descrito as diversas atividades dos líquidos iônicos imidazólicos em diversos sistemas biológico. Neste trabalho, mostramos que os sais imidazólicos apresentam atividade antitumoral em linhagens de glioblastoma e glioma. Testando concentrações na escala nanomolar, observamos uma diminuição na quantidade de células viáveis e no número de células após o tratamento das linhagens com os sais imidazólicos, além de alterações na morfologia das células tratadas. O efeito dos sais imidazólicos nas células variou dependendo do tipo de célula. Nas linhagens C6 e U87-MG, esses compostos tiveram um efeito antiproliferativo devido à indução de parada no ciclo celular. Na linhagem MJ, não houve alteração nas fases do ciclo celular em relação ao controle, o que indica que a diminuição no número de células e viabilidade poderia estar ocorrendo devido à morte celular. A linhagem U138, por sua vez, apresentou um deslocamento da fase G1 para G2, porém mais estudos devem ser realizados para elucidar este parâmetro.

Sendo assim, as perspectivas deste trabalho são:

- Realizar ensaio de morte celular com anexina V e iodeto de propídeo para determinar se está ocorrendo morte por necrose ou apoptose após o tratamento com os sais imidazólicos, principalmente na linhagem M059J.
- Esclarecer o efeito dos sais imidazólicos no ciclo celular na linhagem U138 e realizar ensaio de morte celular com anexina V e iodeto de Propídeo para tentar explicar as alterações causadas após os tratamentos.
- Investigar o mecanismo de ação molecular dos sais imidazólicos no efeito antiproliferativo nas linhagens C6 e U87-MG, bem como os mecanismos de ação nas linhagens M059J e U138.
- Avaliar o efeito citotóxico dos sais imidazólicos em culturas primárias de astrócitos.

V. BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

ANDERSON, E. B.; LONG, T. E. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. **Polymer**, v. 51, n. 12, p. 2447–2454, 2010.

BRAUNSTEIN, J. **Advances in Molten Salts Chemistry**. 1. ed. Plenum Press, New York: Plenum Press, 1971.

CDC CANCER. **Data Collection of Primary Central Nervous System Tumors**. [s.l: s.n.].

DEMBERELNYAMBA, D. et al. Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 853–857, 2004.

DOLECEK, T. A. et al. N E U R O - O N C O L O G Y CBTRUS Statistical Report : Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005 – 2009. 2012.

FRADE, R. F. M.; AFONSO, C. A. M. Impact of ionic liquids in environment and humans: An overview. **Human and Experimental Toxicology**, v. 29(12), p. 1038–1054, 2010.

GLOBOCAN 2012 v1.0 Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx>. Acesso em: 10 maio. 2015.

HOUGH, W. L. et al. The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. **New Journal of Chemistry**, v. 31, n. 8, p. 1429, 2007.

KAUSHIK, N. K. et al. Synthesis and antiproliferative activity of ammonium and imidazolium ionic liquids against T98G brain cancer cells. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 13727–13739, 2012.

LOUIS, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annual review of pathology**, v. 1, p. 97–117, 2006.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.

MALHOTRA, S. V.; KUMAR, V. A profile of the in vitro anti-tumor activity of imidazolium-based ionic liquids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 581–585, 2010.

OHGAKI, H. et al. Genetic Pathways to Glioblastoma : A Population-Based Study Genetic Pathways to Glioblastoma : A Population-Based Study. p. 6892–6899, 2004.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 64, n. 6, p. 479–489, 2005a.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathologica**, v. 109, n. 1, p. 93–108, 2005b.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 764–772, 2013.

OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 17, p. 1842–50, 2013.

PATEL, A. P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 344, n. 6190, p. 1396–401, 2014.

PLECHKOVA, N. V; SEDDON, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. **Chemical Society reviews**, v. 37, n. 1, p. 123–150, 2008.

ROGERS, R. D.; SEDDON, K. R. Chemistry. Ionic liquids--solvents of the future? **Science (New York, N.Y.)**, v. 302, n. 5646, p. 792–793, 2003.

SCHREKKER, H. S. et al. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. **MedChemComm**, v. 4, n. 11, p. 1457–1460, 2013.

STOIMENOVSKI, J. et al. Crystalline vs. ionic liquid salt forms of active pharmaceutical ingredients: A position paper. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p. 521–526, 2010.

VERHAAK, R. G. W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010.

WEN, P.; KESARI, S. Malignant Gliomas in Adults — NEJM. **Malignant gliomas in adults**, p. 492–507, 2008.

WILSON, T. A; KARAJANNIS, M. A; HARTER, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. **Surgical neurology international**, v. 5, p. 64, 2014.