

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Arieli Cruz de Sousa

**AVALIAÇÃO DO MEDICAMENTO ANTI-HIPERTENSIVO DOXAZOSINA  
COMO POTENCIAL AGENTE ANTIPROLIFERATIVO NAS  
CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS**

Porto Alegre

2021

Arieli Cruz de Sousa

**AVALIAÇÃO DO MEDICAMENTO ANTI-HIPERTENSIVO DOXAZOSINA  
COMO POTENCIAL AGENTE ANTIPROLIFERATIVO NAS  
CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dra. Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma

Coorientador(a): Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

2021

## CIP - Catalogação na Publicação

Cruz de Sousa, Arieli

Avaliação do medicamento anti-hipertensivo doxazosina como potencial agente antiproliferativo nas células estreladas hepáticas / Arieli Cruz de Sousa.

-- 2021.

52 f.

Orientadora: Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma.

Coorientador: Jarbas Rodrigues de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Fibrose hepática. 2. Receptores adrenérgicos. 3. Cirrose hepática. 4. Fígado. 5. Células estreladas do fígado. I. Theresinha Costa Rodrigues Guma, Fátima, orient. II. Rodrigues de Oliveira, Jarbas, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, por serem os meus maiores exemplos de resiliência e tornarem a minha graduação possível. Gostaria de agradecer principalmente pelo apoio e incentivo sempre.

Ao meu namorado Vinícius, que esteve presente desde a minha graduação, seleção de mestrado, escrita da dissertação, seleção de doutorado e todos os choros de quando os experimentos não deram certo, sempre me dando apoio e tentando fazer eu acreditar no meu potencial.

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório 21, que mesmo longe durante a pandemia, nunca deixaram de estar presentes, me auxiliando com conselhos, tirando dúvidas e compartilhando os anseios e alegrias da pós-graduação. Obrigada Pati, Vini, Cari e Lucas por sempre me receberem com todo o carinho no novo laboratório de vocês. Obrigada LÍlian, Hémelin e Matheus pelas tardes e bolachas compartilhadas, tenho certeza que logo poderemos ter esses momentos novamente. Obrigada, Renata, minha IC, por todo o auxílio e paciência. Obrigada Mari Ilha e Babi, que embora estejam longe, sei que posso dar um grito quando precisar. Obrigada Cleverson e Leo por compartilharem comigo o amor pelas células estreladas hepáticas desde quando eu estava na graduação. E por último, mas não menos importante, muito obrigada Jéssica, por ter sido a minha dupla durante o mestrado, por ter compartilhado todos os momentos comigo, como ficar até de noite fazendo experimento ou fazer reunião em pleno o sábado à tarde, com certeza a tua amizade foi um presente que o mestrado me deu!

À minha orientadora, Prof. Fátima, muito obrigada por todos os ensinamentos, todas as correções, auxílio e orientação. Tenho certeza que ainda tenho muito o que aprender com a senhora.

Ao meu coorientador, Prof. Jarbas, que sempre deixou as portas do seu laboratório abertas para mim.

Aos queridos colegas do Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Camille, Bruno, Bruna e Carol, obrigada pela amizade e por todo o auxílio quando precisei.

À Daiani Vargas, que passou os dias mais frios do inverno acordando cedo comigo para me ajudar nas padronizações das técnicas de biologia molecular.

Às minhas amigas Caroline, Gabriela e Paula, por me animarem quando eu estava com medo de não dar conta de alguma coisa.

Aos colegas e funcionários do PPG: Bioquímica pela convivência.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

## Sumário

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	6
<b>PARTE I</b> .....	6
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1 Fibrose Hepática</b> .....	11
<b>1.2 Células estreladas hepáticas</b> .....	11
<b>1.3 Reposicionamento de fármacos</b> .....	13
<b>1.4 Doxazosina</b> .....	14
<b>1.5 Modelos de estudo</b> .....	15
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	17
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	17
<b>PARTE II</b> .....	18
<b>4. CAPÍTULO I: MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
<b>4.1 Cultivo celular</b> .....	19
<b>4.2 Tratamento</b> .....	19
<b>4.3 Curva de concentração</b> .....	19
<b>4.4 Proliferação e viabilidade celular</b> .....	20
<b>4.5 Morte Celular por apoptose e necrose</b> .....	21
<b>4.6 Análise morfométrica nuclear (NMA)</b> .....	21
<b>4.7 Detecção de gotas lipídicas</b> .....	21
<b>4.8 Análise estatística</b> .....	22
<b>5. CAPÍTULO II: RESULTADOS</b> .....	23
<b>5.1 Figuras</b> .....	26
<b>PARTE III</b> .....	36
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	43
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>ANEXOS</b> .....	50
<b>Lista de figuras</b> .....	51

# PARTE I

## LISTA DE ABREVIATURAS

AKT: proteína quinase B

$\alpha$ -SMA: actina de músculo liso alfa

CHC: carcinoma hepatocelular

DAPI: 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DCF: doenças crônicas do fígado

DMSO: dimetilsulfóxido

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

FH: fibrose hepática

GRX: linhagem celular de célula estrelada hepática murina

HSC: células estreladas hepáticas (do inglês: *hepatic stellate cells*)

IC50: concentração máxima inibitória para 50% da população

IP3: inositol trifosfato

LX-2: linhagem celular de célula estrelada hepática humana

MEC: matriz extracelular

MMPs: metaloproteinases de matriz

mTOR: alvo mamífero da rapamicina

MTT: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

NMA: análise morfométrica nuclear (do inglês: *nuclear morphometric analysis*)

PBS: solução salina fosfato tamponado

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K: fosfoinosítídeo 3-quinase

PKC: proteína quinase C

SA- $\beta$ -Gal: Beta galactosidase associada a senescência (do inglês: *senescence associated  $\beta$  galactosidase*)

SASP: fenótipo secretório associado a senescência (do inglês: *senescence associated secretory phenotype*)

TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento beta

TIMPs: inibidores de metaloproteinase tecidual

TSD: tetrazolium-succinato-desidrogenase



## RESUMO

A fibrose hepática é caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC) após lesão hepática crônica e pode levar à cirrose. As células estreladas hepáticas (HSC) desempenham um papel crucial durante a fibrogênese, alterando seu fenótipo quiescente para um fenótipo ativado para proteger áreas saudáveis das áreas danificadas. Estratégias para controlar a fibrose hepática envolvem a promoção de apoptose e/ou o retorno ao estado de quiescência das HSC ativadas. A doxazosina é um anti-hipertensivo, antagonista dos receptores alfa-1 adrenérgicos, que também possui efeitos antifibróticos e pró-apoptóticos. Neste estudo, através da estratégia de reposicionamento de fármacos, buscamos avaliar os efeitos da doxazosina nas HSC. Para isso, foram utilizadas duas linhagens celulares de HSCs: LX-2 (humana) e GRX (murina). O efeito da doxazosina sobre a viabilidade e a proliferação destas células foi determinado através dos ensaios de MTT e Sulforrodamina B (SRB), depois de estabelecida uma curva de concentração em função do tempo de exposição ao fármaco. Definimos o tempo de 48 horas e escolhemos as concentrações de 18, 27, 36 e 45  $\mu\text{M}$  para LX-2 e de 13.5, 18, 27 e 36  $\mu\text{M}$  para GRX. A partir dos valores de MTT, determinamos o IC50. A partir do IC50, escolhemos a concentração para avaliação da morte celular: 13.5  $\mu\text{M}$  para GRX e 27  $\mu\text{M}$  para LX-2. Os resultados do MTT e SRB, nas duas linhagens, demonstraram diminuição significativa na viabilidade e confluência. A análise da morte celular mostrou que nas LX-2, esse efeito está relacionado com indução de apoptose. Porém, nas GRX, a análise morfométrica nuclear sugere a indução de senescência celular, observada pelos núcleos aumentados no tratamento com doxazosina. A confirmação da indução de senescência celular será feita através da atividade da  $\beta$ -galactosidase. Como perspectivas futuras, pretendemos, em ambas as linhagens, determinar o quanto o tratamento interfere no estado de ativação das células, pela expressão de proteínas marcadoras de ativação como,  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I e TGF- $\beta$ .

## ABSTRACT

Hepatic fibrosis is characterized by the accumulation of extracellular matrix (ECM) after chronic liver injury and can lead to cirrhosis. Hepatic stellate cells (HSC) play an essential role in fibrogenesis, change their quiescent phenotype to an activated phenotype to protect healthy areas from damaged areas. Strategies to control liver fibrosis involve the promotion of apoptosis and/or the return to the quiescence state of activated HSC. Doxazosin is an antihypertensive, alpha-1-adrenergic receptor antagonist, which also has antifibrotic and proapoptotic effects. In this study, through the drug repositioning strategy, we assess the effects of doxazosin on HSC. Were used two cell lines of HSC: LX-2 (human) and GRX (murine). The effect of doxazosin on the viability and proliferation of these cells was determined using MTT and Sulforhodamine B (SRB) assays, after establishing a concentration curve as a function of drug exposure time. We defined the time of 48 hours and chose the concentrations of 18, 27, 36 and 45  $\mu\text{M}$  for LX-2 and 13.5, 18, 27 and 36  $\mu\text{M}$  for GRX. We determine the IC<sub>50</sub> from the MTT values. The results of MTT and SRB, in both lineages, showed a significant decrease in viability and confluence. The analysis of cell death showed that in LX-2, this effect is related to induction of apoptosis. However, in GRX, the nuclear morphometric analysis showed the induction of cell senescence, observed by the enlarged nuclei in the treatment with doxazosin. Confirmation of cell senescence induction will be done through the activity of  $\beta$ -galactosidase. Future perspectives are to assess how much the treatment interferes in the state of cell activation, through the expression of activation marker proteins such as  $\alpha$ -SMA, type I collagen and TGF- $\beta$ .

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Fibrose Hepática**

As doenças crônicas do fígado (DCF) são responsáveis por 2 milhões de mortes por ano no mundo, sendo a cirrose a 11ª causa de morte mais comum atualmente (Asrani et al. 2019). A progressão das DCF, independente de sua etiologia, é caracterizada por lesões parenquimatosas crônicas e ativação persistente da resposta inflamatória, assim como pela ativação sustentada da fibrogênese hepática e da resposta à cicatrização de feridas (Parola and Pinzani 2019).

A fibrose hepática (FH) é um processo dinâmico caracterizado pela deposição excessiva de matriz extracelular (MEC), formando um tecido cicatricial, após um dano crônico ao fígado, com o intuito de isolar o local da lesão dos tecidos saudáveis. As lesões crônicas no fígado podem ser causadas por infecções virais como as hepatites B e C, abuso alcoólico, toxinas, acúmulo de metais pesados, doença hepática gordurosa não alcoólica e doenças genéticas (Kisseleva and Brenner 2021). O depósito excessivo de MEC perturba a arquitetura normal do fígado, resultando em danos fisiopatológicos ao órgão (Parsons et al. 2007).

Se a FH não for diagnosticada e tratada, pode progredir para cirrose, o que pode levar a diversas complicações como insuficiência hepática funcional, sangramento de varizes esofágicas (as quais se desenvolvem devido a hipertensão portal), ascite, encefalopatia hepática, infecção bacteriana sistêmica, câncer hepático (especialmente, carcinoma hepatocelular) e morte (Friedman 2008a; Pellicoro et al. 2014).

### **1.2 Células estreladas hepáticas**

As células estreladas hepáticas (HSC, do inglês *Hepatic Stellate Cells*) localizam-se no espaço subendotelial, entre a superfície basolateral dos hepatócitos e o lado anti-luminal das células endoteliais sinusoidais, e são conhecidas como a principal fonte de proteínas de matriz extracelular no fígado após um dano (Higashi et al. 2017). Em condições normais, essas células

atuam como pericitos que armazenam vitamina A em gotas lipídicas localizadas em seu citoplasma e apresentam baixas taxas de proliferação e de síntese de colágeno tipo I, o que caracteriza seu fenótipo “quiescente” (Kisseleva and Brenner 2021).

Porém, quando há uma lesão hepática crônica, essas células passam por um complexo processo de transformação e ativação, no qual mudam a sua morfologia de uma célula “quiescente” armazenadora de vitamina A para um miofibroblasto “ativado”. Esse processo está associado à expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e aumento da contratilidade citoplasmática, à perda dos estoques de vitamina A e ao aumento substancial das taxas de proliferação celular (Friedman 2008b; Lee and Friedman 2020; Figura 1).

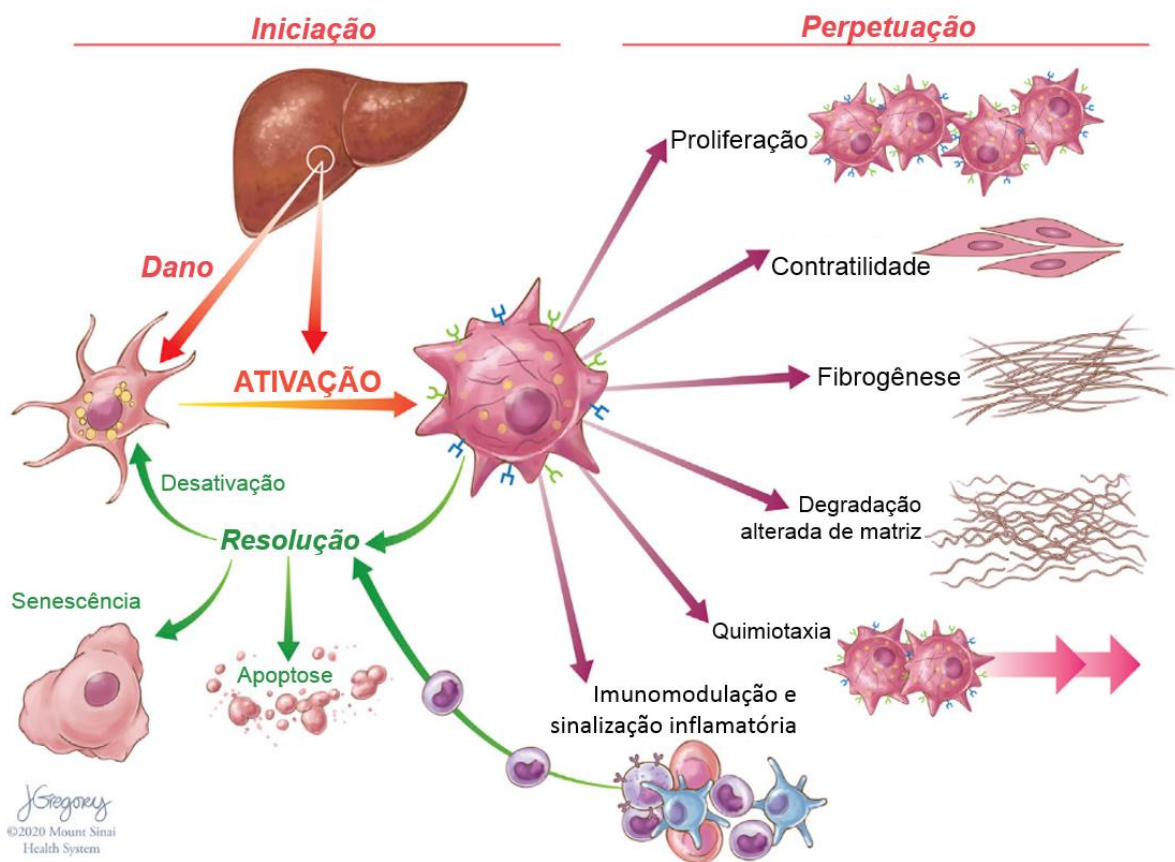
A HSC ativada torna-se responsiva tanto às citocinas proliferativas, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), quanto às fibrogênicas, como o fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). O TGF-  $\beta$  é a citocina pró-fibrogênica mais potente para as HSC ativadas. Além disso, essas células convertidas em miofibroblastos produzem proteínas fibrogênicas, incluindo colágenos tipo I e III, e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que inibem a degradação da MEC através da supressão das atividades de metaloproteinases de matriz (MMPs) (Tsuchida and Friedman 2017; Trivedi et al. 2020).

Outra via importante de ativação das HSC é através de seus receptores adrenérgicos. Já foi demonstrado que neurotransmissores simpáticos, como a norepinefrina, são capazes de ativar as HSC, aumentando seus níveis de proliferação e viabilidade celular e a expressão de proteínas como colágeno tipo I e TGF-  $\beta$  que atuam na fibrogênese (Oben et al. 2004).

Evidências de estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que a fibrose do tecido hepático pode ser interrompida e até revertida após a retirada da causa subjacente da doença. Isso está associado a uma diminuição significativa e progressiva do número de miofibroblastos devido à apoptose ou indução de senescência seguida morte mediadas por células NK, e à reversão para um fenótipo mais quiescente. Esta regressão está relacionada à redução da produção de

colágeno, bem como a diminuição da expressão de TIMP-1 e a um aumento na atividade da collagenase e elastase hepática, resultando na degradação e remodelação da MEC (Parola and Pinzani 2019).

Durante a regressão da fibrose hepática, as células estreladas hepáticas ativadas podem sofrer apoptose ou reversão para um fenótipo inativado; as células inativadas têm um fenótipo semelhante, mas distinto das células estreladas hepáticas quiescentes (Kisseleva and Brenner 2021).



**Figura 1:** Mecanismos de ativação das HSC e resolução. Imagem adaptada de Trivedi P, Wang S e Friedman SL, 2020.

### 1.3 Reposicionamento de fármacos

O reposicionamento de fármacos é caracterizado pela busca de novos efeitos/alvos de um fármaco já estabelecido na indústria e tem sido bastante discutido nos últimos anos (Mittal and Mittal 2021). Nesse tipo de estudo, pode-se reduzir as etapas necessárias antes de se estabelecer os ensaios clínicos, pois fármacos já utilizados possuem sua biodistribuição,

farmacodinâmica e farmacocinética conhecidas. Por exemplo, a talidomida originalmente foi desenvolvida como antiemético, mas foi retirada do mercado após crianças nascidas de mães que tomaram o medicamento apresentarem defeitos congênitos. Posteriormente, foi comprovada a eficácia deste fármaco, sendo reposicionado para o tratamento de eritema nodoso hansênico e mieloma múltiplo (Pushpakom et al. 2018).

O uso do reposicionamento pode evitar diversos problemas que acabam com o processo de desenvolvimento de novos fármacos. Alguns desses problemas incluem: seletividade do alvo, metabolismo do fármaco e farmacocinética, toxicologia e eventos adversos (Bastos and Coelho 2014; Waring et al. 2015). A vantagem de investigar efeitos secundários de moléculas que estejam no mercado está relacionada com o tempo e o custo gerados na pesquisa e desenvolvimento do fármaco. Por exemplo, o tempo de pesquisa para a produção e aprovação de um novo medicamento pode levar em média 17 anos, enquanto o reposicionamento pode reduzir esse processo em aproximadamente 5 anos (Ashburn and Thor 2004; Paul et al. 2010).

#### **1.4 Doxazosina**

A doxazosina [4-(4-amino-6,7-dimetoxiquinazolina-2-il)-piperazina] 1-il-(2,3-diidro-1,4-benzodioxina-3-il) metanona é um derivado quinazolínico que pertence à classe terapêutica dos alfa-bloqueadores adrenérgicos. Esse fármaco bloqueia seletivamente os receptores alfa-1 adrenérgicos e é utilizado clinicamente como mesilato de doxazosina (Carduran®) para o tratamento de hipertensão e hiperplasia prostática benigna (Fulton et al. 1995; Wykretowicz et al. 2008).

Além dos seus efeitos anti-hipertensivos já conhecidos, a doxazosina apresentou efeitos antitumorais no câncer de próstata (Benning and Kyprianou 2002), no câncer de mama (Hui et al. 2008), em glioblastoma (Gaelzer et al. 2016a) e neuroblastoma (Coelho et al. 2019). Nesses casos, seu mecanismo de ação foi independente de sua ação inibitória dos receptores alfa-1 adrenérgicos, causando apoptose das células tumorais por outras vias como, por exemplo, por

inibição da via PI3K/Akt, inibição dos receptores de EGF e aumento da autofagia (Hui et al. 2008; Gaelzer et al. 2016; Suzuki et al. 2020).

Foi demonstrado que a doxazosina tem capacidade de reduzir marcadores fibróticos como o TGF- $\beta$ , em um modelo de FH em hamsters, por meio da inibição dos receptores alfa-1-adrenérgicos localizados no fígado. Além disso, a doxazosina foi capaz de atenuar a FH ativando a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, inibindo a autofagia e induzindo a apoptose de HSC ativadas em camundongos e na linhagem celular humana LX-2 (Muñoz-Ortega et al. 2016; Xiu et al. 2021). Sendo assim, consideramos relevante investigar os efeitos da doxazosina em diferentes linhagens de células estreladas hepáticas para compreender os seus mecanismos de ação.

### **1.5 Modelos de estudo**

Para estudos da fibrose hepática, existem métodos *in vivo* e *in vitro* que podem mimetizar as condições fisiológicas dessa patologia. Um dos métodos *in vitro* é a cultura primária ou de linhagens permanentes de células estreladas hepáticas, sendo a linhagem humana LX-2 e a murina GRX exemplos bastante conhecidos. A linhagem LX-2 foi isolada de tecido hepático saudável humano, a partir do tratamento com colagenase/pronase seguido de fracionamento por gradiente de densidade de Nycodenz. Essas células são capazes de se diferenciar de um fenótipo com “características quiescentes” para o fenótipo ativado/miofibroblastóide durante o tempo em cultura (Xu et al. 2005; Yanguas et al. 2016). Já a linhagem GRX é composta por fibroblastos hepáticos isolados de granulomas induzidos em camundongos pela infecção experimental com cercárias de *Schistosoma mansoni*. A GRX é adequada para estudar a fibrose pois pode apresentar diferentes estados de ativação, transitando entre o fenótipo ativado miofibroblastóide e um fenótipo com características de HSC quiescentes, armazenadoras de lipídeos em gotas citoplasmáticas (Borojevic et al. 1985; Guma et al. 2001).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A fibrose hepática pode progredir para cirrose, o que leva a morte de muitos pacientes; sendo assim, as pesquisas para tratamentos alternativos são importantes. Tendo em vista que a doxazosina tem demonstrado efeitos pró-apoptóticos *in vitro* e anti-fibróticos *in vivo*, e o reposicionamento de fármacos é uma ótima estratégia para reduzir o tempo de pesquisa antes dos ensaios clínicos pois já se conhece a farmacologia do medicamento estudado, torna-se pertinente investigar seus efeitos nas HSC ativadas das linhagens LX-2 e GRX.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da doxazosina sobre as células estreladas hepáticas representadas pelas linhagens LX-2 e GRX.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da doxazosina sobre a proliferação e a viabilidade celular.
- Verificar a citotoxicidade da doxazosina nas células estreladas hepáticas.
- Analisar se a doxazosina reverte o fenótipo ativado das células hepáticas estreladas.

## **PARTE II**

## **4. CAPÍTULO I: MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Cultivo celular**

Foram utilizadas duas linhagens de células estreladas hepáticas: a GRX, linhagem murina, estabelecida pelo Dr. Radovan Borojevic na década de 1980, proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro, e a LX-2, linhagem humana enviada pela Prof<sup>a</sup> Dra Karen C.M. Moraes da UNESP com autorização do Dr. Scott L. Friedman. Ambas foram cultivadas em meio DMEM *low glucose* com pH fisiológico de 7,4, suplementado com 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) e 5% (GRX) ou 10% (LX-2) de soro fetal bovino, e mantidas em uma incubadora umidificada com temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada 48 horas e as células foram observadas por microscópio invertido. Quando o crescimento celular atingiu a confluência adequada, em torno de 80%, as culturas foram tratadas com solução de tripsina/EDTA e a suspensão celular foi semeada em quantidades adequadas e em recipientes (garrafas ou placas) próprios para cada metodologia.

### **4.2 Tratamento**

Para os tratamentos, inicialmente, foi preparada uma solução estoque de 1,8 mM de mesilato de doxazosina em 20% etanol/água Milli-Q (veículo). Posteriormente, as células foram tratadas com concentrações que variaram entre 0,9 a 54 µM, por 24, 48 e 72 horas para o estabelecimento de uma curva de concentração e cálculo do IC<sub>50</sub>.

### **4.3 Curva de concentração**

Para a realização da curva de concentração, foi feita a análise da confluência das culturas por meio da citometria de imagem, utilizando o leitor de placas SpectraMax i3 MiniMax 300 Imaging Cytometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com o módulo de imagem óptica e configuração de luz transmitida. A tecnologia de detecção de células StainFree™ da Molecular Devices permite a estimativa da confluência celular e da citotoxicidade e é

comparável às contagens nucleares e de células inteiras obtidas usando corantes fluorescentes (Molecular Devices, 2019). Além disso, as células podem ser analisadas a qualquer momento sem interromper seu crescimento.

As fotomicrografias foram capturadas 24 h após a semeadura e antes do tratamento com doxazosina (tempo 0 h). Fotomicrografias adicionais foram capturadas sem perturbar o crescimento celular a cada 24 horas e a confluência de células por poço foi determinada. Esta abordagem de curso de tempo permitiu a análise temporal da proliferação celular.

#### **4.4 Proliferação e viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada a partir do ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Esse ensaio demonstra a atividade mitocondrial expressa por meio da enzima tetrazolium-succinato-desidrogenase (TSD). O MTT, sal de coloração amarela e solúvel em água, é reduzido a cristais de formazan, sal de coloração roxa e insolúvel em água. Portanto, a redução do MTT à formazan será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, assim, à viabilidade celular. Após o tratamento com a doxazosina, as células foram incubadas com uma solução de MTT (5 mg/mL) por 2 horas a 37 °C. As células foram então lisadas em dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilização dos sais de formazan formados e a absorbância foi mensurada a 540 nm no espectrofotômetro SpectraMax® M5. Os resultados foram utilizados para os cálculos do IC50 em ambas as linhagens.

Outro método que avaliou a viabilidade e confluência celular foi o ensaio com o corante Sulforrodamina B. Neste método, é possível se ter uma estimativa de densidade populacional e, conseqüentemente, de sobrevivência celular. Após o tratamento, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em solução salina fosfato tamponado (PBS) e coradas com 0,4% de corante Sulforrodamina B solubilizado em ácido acético. As células coradas foram

dissolvidas em detergente SDS (1%) e a absorbância da solução resultante foi medida em espectrofotômetro SpectraMax® M5 a 515 nm.

#### **4.5 Morte Celular por apoptose e necrose**

A quantificação e caracterização da morte celular foram realizadas por citometria de fluxo, com o kit Anexina V-FITC / Iodeto de Propídio (QuatroG). Após 48 horas de tratamento com as concentrações de doxazosina escolhidas após o cálculo do IC50 (13,5  $\mu$ M para GRX e 27  $\mu$ M para LX-2), as células foram colhidas por tripsinização e lavadas com PBS. Em seguida, o pellet celular foi suspenso em 100  $\mu$ L de tampão de ligação 1X a uma densidade celular de  $1 \times 10^6$  células / mL e incubadas com 2  $\mu$ L de Anexina V-FITC e 2,5  $\mu$ L de iodeto de propídio (PI) por 15 min em temperatura ambiente protegido da luz. A análise de fluorescência foi realizada pelo citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ e os dados foram analisados usando o *software* FCS Express 4.

#### **4.6 Análise morfométrica nuclear (NMA)**

A análise do tamanho e irregularidade nuclear foi realizada a partir da coloração do núcleo com DAPI, nas células GRX. As células foram semeadas em placas de 24 poços ( $2,5 \times 10^4$  por poço) e após 48 horas de tratamento com a doxazosina, o meio foi retirado e as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com DAPI. O NMA foi realizado usando o *software* Image-Pro Plus 6.0. Diferentes fenótipos nucleares foram separados em um gráfico de área versus índice de irregularidade nuclear e núcleos de células tratadas com o veículo foram usados para definir os parâmetros normais (Filippi-Chiela et al. 2012).

#### **4.7 Detecção de gotas lipídicas**

A presença de gotas lipídicas citoplasmáticas foi determinada pelo ensaio AdipoRed™ (Lonza Wlakersville.Inc., USA). As células foram semeadas em placas de 24 poços ( $2,5 \times 10^4$  por poço) e após 48 horas de tratamento com a doxazosina (concentrações do IC50), o meio foi

retirado e as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com AdipoRed, para coloração de fosfolipídios e triglicerídeos, e com DAPI para coloração do núcleo. O AdipoRed é uma solução do corante hidrofílico Vermelho do Nilo (*Nile Red*) que emite fluorescência em meio hidrofóbico. O corante, quando ligado a proteínas ou fosfolipídios de membrana, emite fluorescência vermelha (excitação em 550nm e emissão em 638 nm) e, quando ligado aos triglicerídeos das gotas lipídicas citoplasmática, emite fluorescência amarelo-esverdeada (excitação em 485 nm e emissão em 572 nm). As imagens foram capturadas diretamente dos poços das placas de cultura no microscópio FLoid™ Cell Imaging Station. Foram realizadas três capturas de cada poço cultivado.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Verificamos a normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk. O teste ANOVA de uma via foi utilizado para avaliar o efeito da doxazosina conforme as concentrações. Quando necessário, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias (concentração X tempo). O *Post Hoc Test* de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ , com intervalo de confiança de 95%. Os dados foram analisados no *software* GraphPad Prism 7 (versão 7.04).

## **PARTE III**

## **7. CONCLUSÃO**

Essa dissertação apresentou os efeitos da doxazosina em duas linhagens diferentes de células estreladas hepáticas, a linhagem GRX, de origem murina, e a linhagem LX-2, de origem humana. Em ambas linhagens foi observado o potencial antiproliferativo da doxazosina, atuando por indução de apoptose nas células LX-2 e possivelmente por senescência nas células GRX. Mais estudos são necessários para averiguar se o efeito da doxazosina nas células estreladas hepáticas está relacionado à sua ação inibitória dos receptores alfa-1 adrenérgicos ou por outro mecanismo.



## 8. PERSPECTIVAS

Como continuação desse trabalho, pretende-se seguir com os seguintes objetivos:

- Avaliar se o tratamento com a doxazosina é capaz de diminuir a expressão de genes relacionados a ativação das HSC, como o colágeno tipo I, TGF- $\beta$  e  $\alpha$ -SMA;
- Realizar a quantificação das gotas lipídicas citoplasmáticas, afim de verificar se o tratamento com a doxazosina induz a formação das mesmas;
- Avaliar se o tratamento com doxazosina está induzindo senescência celular nas GRX por meio da medição da atividade da  $\beta$ -galactosidase;
- Analisar a contração celular pelo ensaio de gel de colágeno;
- Averiguar se o efeito da doxazosina está sendo causado por sua inibição dos receptores alfa-1 adrenérgicos.

## 9. REFERÊNCIAS

- Ashburn TT, Thor KB (2004) Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3:673–683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>
- Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS (2019) Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol* 70:151–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
- Bastos LFS, Coelho MM (2014) Drug repositioning: Playing dirty to kill pain. *CNS Drugs* 28:45–61. <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0128-0>
- Benning CM, Kyprianou N (2002) Quinazoline-derived  $\alpha$ 1-Adrenoceptor Antagonists Induce Prostate Cancer Cell. *Cancer Res* 62:597–602
- Borojevic R, Monteiro ANA, Vinhas SA, et al (1985) Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *Vitr Cell Dev Biol* 21:382–390. <https://doi.org/10.1007/BF02623469>
- Cervantes-Garcia D, Cuellar-Juarez AG, Borrego-Soto G, et al (2017) Adenoviral-bone morphogenetic protein-7 and/or doxazosin therapies promote the reversion of fibrosis/cirrhosis in a cirrhotic hamster model. *Mol Med Rep* 16:9431–9440. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7785>
- Chang Y, Li H (2020) Hepatic Antifibrotic Pharmacotherapy: Are We Approaching Success? *J Clin Transl Hepatol* 8:1–8. <https://doi.org/10.14218/jcth.2020.00026>
- Coelho BP (2019) Reposicionamento de fármacos : avaliação pré-clínica do uso da doxazosina no combate à tumores pediátricos e na neuroproteção em um modelo da doença de Alzheimer Reposicionamento de fármacos : avaliação pré-clínica do uso da doxazosina no combate à tumore

- Coelho BP, Gaelzer MM, dos Santos Petry F, et al (2019) Dual Effect of Doxazosin: Anticancer Activity on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells and Neuroprotection on an In Vitro Model of Alzheimer's Disease. *Neuroscience* 404:314–325.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.005>
- Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, et al (2012) Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One* 7:.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042522>
- Fortuna VA, Martucci RB, Trugo LC, Borojevic R (2003) Hepatic Stellate Cells Uptake of Retinol Associated With Retinol-Binding Protein or With Bovine Serum Albumin. *J Cell Biochem* 90:792–805. <https://doi.org/10.1002/jcb.10703>
- Friedman SL (2008a) Hepatic fibrosis—Overview. *Toxicology* 254:120–129.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.06.013>
- Friedman SL (2008b) Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* 134:1655–1669. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>
- Fulton B, Wagstaff AJ, Sorkin EM (1995) Doxazosin. *Drugs* 49:295–320
- Gaelzer MM, Coelho BP, De Quadros AH, et al (2016a) Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway Inhibition by Doxazosin Promotes Glioblastoma Cells Death, Upregulation of p53 and Triggers Low Neurotoxicity. *PLoS One* 11:1–18.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154612>
- Gaelzer MM, Coelho BP, De Quadros AH, et al (2016b) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway inhibition by doxazosin promotes glioblastoma cells death, upregulation of p53 and triggers low neurotoxicity. *PLoS One* 11:1–18.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154612>

- Guimarães ELM, Franceschi MFS, Andrade CMB, et al (2007) Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver Int* 27:1255–1264.  
<https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01578.x>
- Guma FC., Mello TG, Mermelstein CS, et al (2001) Intermediate filaments modulation in an in vitro model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype. *Biochem Cell Biol* 79:409–417. <https://doi.org/10.1139/o01-027>
- Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y (2017) Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 121:27–42. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>
- Hui H, Fernando MA, Heaney AP (2008) The  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonist doxazosin inhibits EGFR and NF- $\kappa$ B signalling to induce breast cancer cell apoptosis. *Eur J Cancer* 44:160–166. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.10.002>
- Kisseleva T, Brenner D (2021) Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18:151–166. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
- Krai J, Beckenkamp A, Gaelzer MM, et al (2017) Doxazosin nanoencapsulation improves its in vitro antiproliferative and anticlonogenic effects on breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* 94:10–20. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.048>
- Lee YA, Friedman SL (2020) Stellate Cells and Fibrosis. In: *The Liver: Biology and Pathobiology*, Sixth Edition, Sixth Edit. John Wiley & Sons Ltd, pp 444–454
- Li F, Huangyang P, Burrows M, et al (2020) FBP1 loss disrupts liver metabolism and promotes tumorigenesis through a hepatic stellate cell senescence secretome. *Nat Cell Biol* 22:728–739. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0511-2>

- Mittal N, Mittal R (2021) Repurposing old molecules for new indications: Defining pillars of success from lessons in the past. *Eur J Pharmacol* 912:174569.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174569>
- Muñoz-Ortega MH, Llamas-Ramírez RW, Romero-Delgadillo NI, et al (2016) Doxazosin treatment attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in hamsters through a decrease in transforming growth factor  $\beta$  secretion. *Gut Liver* 10:101–108.  
<https://doi.org/10.5009/gnl14459>
- Oben JA, Roskams T, Yang S, et al (2004) Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 53:438–445. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.026658>
- Oben JA, Yang S, Lin H, et al (2003) Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 302:685–690. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00232-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00232-8)
- Parola M, Pinzani M (2019) Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med* 65:37–55. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>
- Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA (2007) Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 22:79–84. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04659.x>
- Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, et al (2010) How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Drug Discov* 9:203–214.  
<https://doi.org/10.1038/nrd3078>
- Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA (2014) Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 14:181–194.  
<https://doi.org/10.1038/nri3623>

- Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, et al (2018) Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 18:41–58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>
- Sigala B, McKee C, Soeda J, et al (2013) Sympathetic Nervous System Catecholamines and Neuropeptide Y Neurotransmitters Are Upregulated in Human NAFLD and Modulate the Fibrogenic Function of Hepatic Stellate Cells. *PLoS One* 8:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072928>
- Suzuki E, Tsujimoto G, Tamura K, Hashimoto K (1990) Two pharmacologically distinct  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes in the contraction of rabbit aorta: Each subtype couples with a different  $\text{Ca}^{2+}$  signalling mechanism and plays a different physiological role. *Mol Pharmacol* 38:725–736
- Suzuki S, Yamamoto M, Sanomachi T, et al (2020) Doxazosin, a classic Alpha 1-adrenoceptor antagonist, overcomes osimertinib resistance in cancer cells via the upregulation of autophagy as drug repurposing. *Biomedicines* 8:1–12. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8080273>
- Trivedi P, Wang S, Friedman SL (2020) The Power of Plasticity—Metabolic Regulation of Hepatic Stellate Cells. *Cell Metab* 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.026>
- Tsuchida T, Friedman SL (2017) Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14:397–411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
- Wade CA, Goodwin J, Preston D, Kyprianou N (2019) Impact of  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists on prostate cancer development, progression and prevention. *Am J Clin Exp Urol* 7:46–60
- Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, et al (2015) An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov* 14:475–

486. <https://doi.org/10.1038/nrd4609>

Wykretowicz A, Guzik P, Wysocki H (2008) Doxazosin in the current treatment of hypertension. *Expert Opin Pharmacother* 9:625–633.

<https://doi.org/10.1517/14656566.9.4.625>

Xiu A-Y, Ding Q, Li Z, Zhang C-Q (2021) Doxazosin Attenuates Liver Fibrosis by Inhibiting Autophagy in Hepatic Stellate Cells via Activation of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Drug Des Devel Ther* Volume 15:3643–3659.

<https://doi.org/10.2147/dddt.s317701>

Xu L, Hui AY, Albanis E, et al (2005) Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 54:142–151.

<https://doi.org/10.1136/gut.2004.042127>

Yanguas SC, Cogliati B, Willebrords J, et al (2016) Experimental models of liver fibrosis.

*Arch Toxicol* 90:1025–1048. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1543-4>

Zhang M, Serna-Salas S, Damba T, et al (2021) Hepatic stellate cell senescence in liver

fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives. *Mech Ageing Dev* 199:111572.

<https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111572>

# **ANEXOS**



## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Mecanismos de ativação das HSC e resolução.....	13
<b>Figura 2:</b> Efeito da doxazosina sobre a proliferação das células GRX.....	26
<b>Figura 3:</b> Efeito da doxazosina sobre a proliferação das células LX-2.....	26
<b>Figura 4:</b> Fotomicrografias das células GRX após tratamento com doxazosina.....	27
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografias das células LX-2 após tratamento com doxazosina.....	28
<b>Figura 6:</b> Efeito da doxazosina nos diferentes tempos de tratamento com a doxazosina.....	28
<b>Figura 7:</b> Avaliação da confluência celular por Sulforrodamina B após tratamento de 48h com doxazosina.....	29
<b>Figura 8:</b> Avaliação da viabilidade celular por MTT após tratamento de 48h com doxazosina.....	29
<b>Figura 9:</b> Cálculo da concentração inibitória para a metade da população celular.....	30
<b>Figura 10:</b> Análise do tipo de morte celular nas células GRX após tratamento com doxazosina na concentração de 13,5 $\mu$ M por 48 horas.....	31
<b>Figura 11:</b> Análise do tipo de morte celular nas células LX-2 após tratamento com doxazosina na concentração de 27 $\mu$ M por 48 horas.....	32
<b>Figura 12:</b> Análise morfométrica nuclear das células GRX.....	33
<b>Figura 13:</b> Detecção de gotas lipídicas citoplasmáticas nas células GRX.....	34

**Figura 14:** Detecção de gotas lipídicas citoplasmáticas nas células LX-2.....35