

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE DERIVADOS SINTÉTICOS DE AZT EM LINHAGENS CELULARES ATRAVÉS DE ENSAIO DE MTT

MÔNICA SILVEIRA WAGNER^{1,2}; EDUARDA SCHULTZE^{1,2}; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON²; DIEGO DE SOUZA³; OSCAR ENDRIGO DORNELES RODRIGUES³; FABIANA KÖMMLING SEIXAS^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

²Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

³Universidade Federal de Santa Maria

monicasilveirawagner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A síntese de compostos que usam como base a estrutura de nucleosídeos é um campo que possui uma intensa aplicação biológica. Dentre estes compostos, o mais conhecido é a azidotimidina ou zidovudina (AZT), um potente inibidor da replicação do HIV e uma das drogas de escolha para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). No entanto, o AZT teve sua síntese inicial (Horwitz et al, 1964) voltada para ao combate de processos tumorais, mas apesar do baixo poder antitumoral do AZT, a importância dos nucleosídeos na terapia antitumoral vem aumentando, principalmente a introdução de novas drogas nucleosídicas no mercado farmacêutica (Mackey et. al., 1998). Como o desenvolvimento de muitas formas de câncer podem surgir do dano genotóxico causado pelo acúmulo de modificações oxidativas nas bases do DNA e a quebra da vertente única ou dupla hélice do DNA (James et. al, 2003), os compostos organocalcogênicos tem surgido como uma alternativa para o tratamento do câncer, agindo principalmente através de enzimas de detoxificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Steinbrenner, 2009). A capacidade desses compostos para inibir o crescimento celular e para induzir a apoptose de células tumorais é sugerida como um mecanismo potencial para quimioprevenção do câncer (Naithani, 2008). O carcinoma de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres (INCA, 2012). A incidência de câncer mamário está aumentando em países em desenvolvimento devido ao aumento da expectativa de vida, aumento da urbanização e adaptação ao estilo de vida ocidental (WHO, 2012).

Dessa forma, a fim de explorar a base estrutural dos nucleosídeos e as influências biológicas que modificações na posição 5' do anel da desoxirribose do AZT promoveriam em linhagens de câncer de mama, planejou-se a síntese de uma série de nucleosídeos, os 5'-arilseleno azidotimidina. O presente trabalho tem como objetivo contribuir com o desenvolvimento tecnológico na terapêutica do câncer de mama, a partir da identificação de novos fármacos, com potencial antitumoral, avaliando os mecanismos de ação envolvidos e a toxicidade celular destes compostos.

2. METODOLOGIA

2.1 AZT E SUA MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL

A modificação na molécula de AZT (Fig. 1) foi realizada na tentativa de encontrar um derivado com melhores atividades inibitórias sobre células tumorais. Foi realizada uma inserção do átomo de selênio ligado ao grupamento arílico na molécula de AZT.

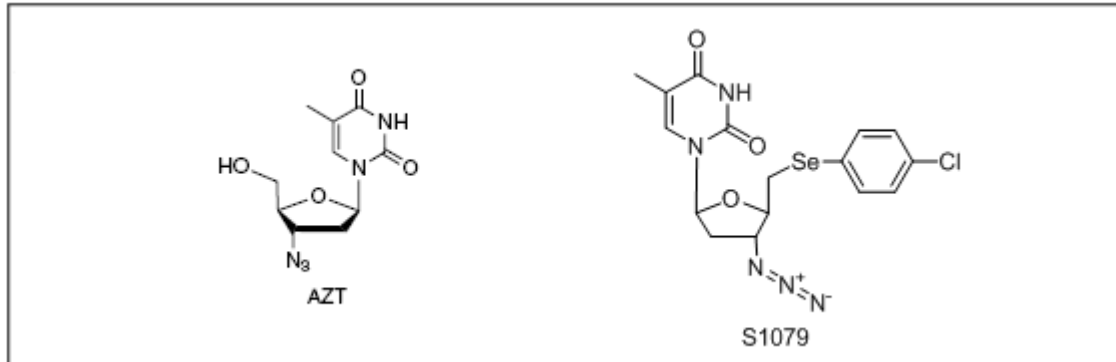


Figura 1. Estrutura química do AZT e seu derivado sintético.

2.2 CULTURA CELULAR

As linhagens celulares, CHO (não-tumoral derivada de ovário de hamster) e MDA-MB231 (tumoral invasiva derivada de mama humana) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Foram cultivadas em DMEM e Leibovitz, respectivamente, onde foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram mantidas a 37 °C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

2.3 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXIDADE

As células foram semeadas numa densidade de 10⁴ células por poço em uma placa de 96 poços contendo 100 µL de meio + 10% de FBS em cada poço. Após 24 horas em estufa, a morfologia celular foi avaliada em microscópio e foram testadas as seguintes concentrações dos compostos: **0,1; 1; 10; 50 e 100 µM** nos tempos de **4, 24, 48 e 72 horas**. Para tanto, foi utilizada uma alíquota do derivado de AZT diluídos em DMSO na concentração de 40.000 µM, previamente preparada para que a concentração de DMSO nos poços não ultrapassasse 0,2%, o que poderia ser tóxico para as células. Além disso, na mesma placa foram realizados os controles negativos: DMEM+FBS; DMSO e branco (sem células).

Após o tempo determinado, foi realizado o teste de proliferação celular por ensaio colorimétrico de MTT. Neste ensaio, o meio é removido e a cada poço é adicionado 20 µL de MTT (5mg/mL) com 180 µL de DMEM+FBS. Após 2 horas na estufa, os cristais de formazan formados pela degradação do MTT pelas células vivas são diluídos pela adição de DMSO e a leitura da reação é feita em 630 nm. Cada resultado será proveniente da média das absorvâncias de 3 poços diferentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 2 mostra a taxa de inibição de crescimento celular observada nos compostos AZT e AZT₁₀₇₉, nas duas linhagens celulares, nas diferentes

concentrações e tempos de incubações. Na linhagem não-tumoral CHO, no composto AZT₁₀₇₉ foi observada uma diferença estatística significativa ($p < 0,005$) de acordo com a concentração utilizada (Fig. 2A) e no composto AZT foi observado diferença tanto no tempo de incubação quanto na concentração utilizada (Fig. 2B). Na linhagem tumoral MDA-MB 231, no composto modificado, AZT₁₀₇₉, houve diferença significativa no tempo e concentração utilizada ($p < 0,005$), onde os tempos de 48 e 72h, nas concentrações de 50 e 100 μM apresentaram uma taxa de inibição superior às demais testadas (Fig. 2C) e no composto AZT, foi observada diferença, tanto no tempo, concentração e ainda quando comparado tempo \times concentração (Fig. 2D); quando observado os dois compostos, o AZT₁₀₇₉ apresentou taxas de inibição superiores quando comparado com a molécula de AZT em ambas as células e apresentou maior taxa de inibição na linhagem tumoral. Estes dados corroboram com os resultados encontrados por L. Celewicz et al., (2011) onde demonstrou que o tratamento de linhagens celulares tumorais com AZT induziu citotoxicidade. No estudo de Wagner, et al (1997), demonstrou também atividade antiproliferativa do AZT em linhagens tumorais de mama.

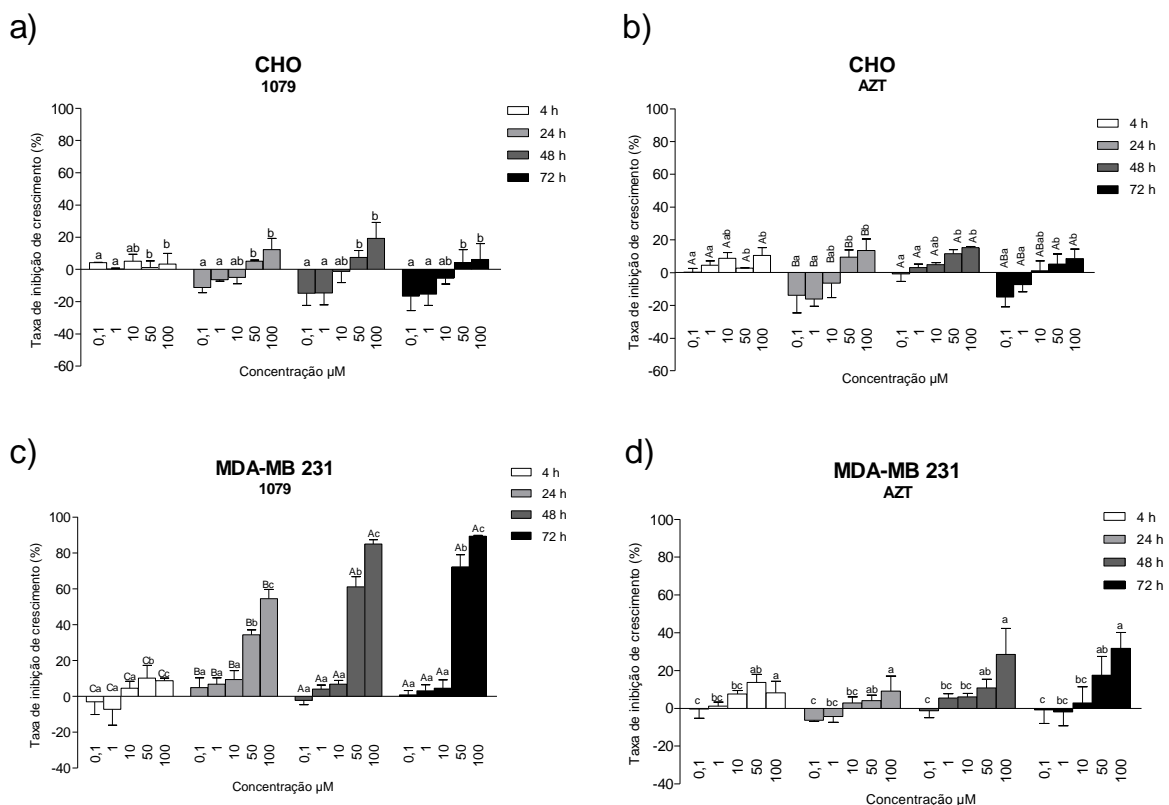


Figura 2. Taxa de inibição de crescimento celular observada nos compostos AZT e AZT-Se-Cl nas linhagens CHO (não-tumoral derivada de ovário de hamster) e MDA-MB 231 (tumoral invasiva derivada de mama humana) nas diferentes concentrações (0,1 μM , 1,0 μM , 10 μM , 50 μM e 100 μM). a) Taxa de inibição na linhagem CHO no composto 1079; b) Taxa de inibição na linhagem CHO no composto AZT; c) Taxa de inibição na linhagem MDA-MB 231 no composto 1079; d) Taxa de inibição na linhagem MDA-MB 231 no composto AZT; letras minúsculas indicam diferenças entre concentrações e letras maiúsculas entre tempo de tratamento.

4. CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, concluiu-se que a atividade antiproliferativa foi superior na linhagem tumoral em relação à linhagem não-tumoral e que o derivado sintético de AZT₁₀₇₉ teve uma maior atividade inibitória. São necessários mais estudos para avaliar profundamente a atividade deste novo composto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Horwitz, J.P.; Chua, J.; Noel, M. Nucleosides. IV. the monomesylates of 1-(2'-deoxy- β -D-lyxofuranosyl) thymidine. **The Journal of Organic Chemistry**, v.29, p. 2076-2078, 1964.

Mackey, J.R., Baldwin, S.A.; Young, J.D.; Cass C.E. Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance. **Drug Resistance Updates**, v.1, p.310-324, 1998.

James L.P.; Mayeux P.R; Hinson J.A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p.1499–506, 2003.

Steinbrenner, H.; Sies, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p. 1478-1485, 2009.

Naithani, R. Organoselenium compounds in cancer chemoprevention. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 657-668, 2008.

INCA. **Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2010**. Ministério da Saúde. Acessado em: 08 out.. 2013. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/>

World Health Organization. **Breast cancer: prevention and control**. Data and statistics. Acessado em: 08 out.. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>

Celewicz, L.; Józ'wiak, A.; Ruszkowski, P.; Laskowska, H.; Olejnik, A.; Czarnecka, A.; Hoffmann, M.; Hładon, B. Synthesis and anticancer activity of 50 chloromethylphosphonates of 30-azido-30-deoxythymidine (AZT). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 6375–6382, 2011.

Wagner, C. R.; Ballato, G.; Akanni, A.; McIntee, E. J.; Larson, R. S.; Chang, S.; Abul-Hajj, Y. J. Potent Growth Inhibitory Activity of Zidovudine on Cultured Human Breast Cancer Cells and Rat Mammary Tumors. **Cancer Research**, v.57, p. 2341-2345, 1997.