

## AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE APOPTOSE POR DERIVADOS SINTÉTICOS DE AZT EM LINHAGENS CELULARES ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO

EDUARDA SCHULTZE<sup>1,2</sup>; MÔNICA SILVEIRA WAGNER<sup>1,2</sup>; HELENA STRELOW THUROW<sup>2</sup>; DIEGO DE SOUZA<sup>3</sup>; OSCAR ENDRIGO DORNELES RODRIGUES<sup>3</sup>; FABIANA KÖMMLING SEIXAS<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Maria

dudashultze@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

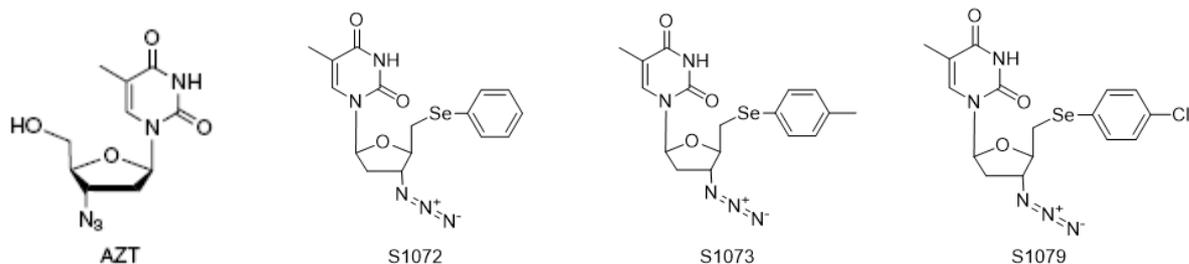
O AZT (3'-Azido-3'-deoxythymidine) ou zidovudina, é um composto utilizado no tratamento da imunodeficiência adquirida (AIDS), devido a sua atividade anti-retroviral e inibidora da transcriptase reversa. Este composto também apresenta atividade antitumoral devido a inibição do crescimento celular, inibição da telomerase e da timidina quinase (WAGNER et al., 1997; CHOW WA et al., 2009; PRIEGO EM et al., 2012). Muitos trabalhos tem demonstrado o potencial de uso terapêutico do AZT contra tumores, principalmente de mama (JI HJ et al., 2005; MODICA-NAPOLITANO JS, et al., 2003)

Por ser um nucleosídeo sintético que não possui a hidroxila da posição 3', o AZT é capaz de interromper o alongamento da cadeia do DNA e de agir como inibidor competitivo da timidina-quinase (WEBBER et al., 1990). Além disso, pode induzir toxicidade mitocondrial, através da inibição da síntese de DNA mitocondrial (SCRUGGS; DIRKS NAYLOR, 2008). Entretanto, estas características também são responsáveis pelos efeitos colaterais indesejáveis do composto (SCRUGGS; DIRKS NAYLOR, 2008). Modificações na estrutura do AZT tem sido realizadas na busca por derivados e análogos que apresentem efeitos mais relevantes em células tumorais e com menor efeito sobre as células não-tumorais. O presente trabalho tem como objetivo comparar o potencial de indução de apoptose por AZTs modificados sobre células de adenocarcinoma de mama e células não tumorais a fim de contribuir com o desenvolvimento de possíveis novas abordagens terapêuticas para o câncer de mama.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS DE AZT

As moléculas modificadas foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa do professor Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues da UFSM. O grupo trabalha com alterações na estrutura do AZT na busca por um derivado com melhores atividades antitumorais. Assim, o grupamento hidroxila (-OH) da molécula de AZT foi substituído por outros grupamentos, conforme ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** AZT e moléculas derivadas com substituintes no grupamento hidroxila.

## 2.2 CULTURA CELULAR

Fibroblastos de ovário de hamster (linhagem CHO) e células de adenocarcinoma de mama humano (linhagem MDA-MB231) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e foram cultivadas, respectivamente, em DMEM e Leibovitz suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células cresceram em atmosfera controlada a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

## 2.3 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE APOPTOSE

As células foram cultivadas em placas de 12 poços com uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço por 24 horas em estufa antes da adição dos tratamentos. Foram testadas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  por 48h, pois concentrações mais baixas não apresentaram efeito inibitório significativo avaliado anteriormente por MTT. Foram avaliados também o controle negativo (DMEM+SFB) e o controle do veículo de diluição dos AZTs (DMSO) no maior volume relativo.

Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas, coletadas e contadas para a realização da coloração com Annexin V-PE/7AAD conforme instruções do fabricante. Após 20 min de incubação com o corante, as células foram analisadas em citômetro de fluxo.

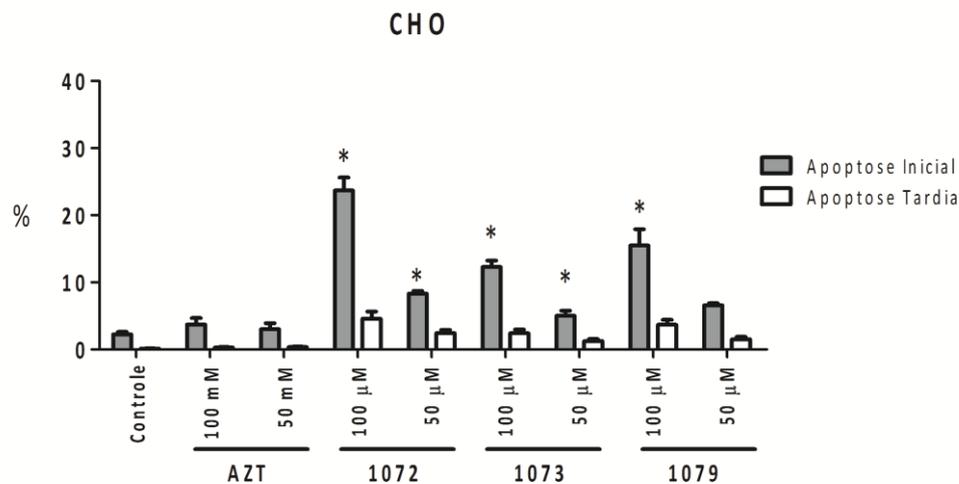
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes evidenciaram seletividade da indução de apoptose dos compostos sobre células tumorais. As células não tumorais, linhagem CHO, apresentaram um percentual médio de células em apoptose inicial [Annexin V-PE (+)/7AAD (-)] de 23,6%, 15,4%, 12,2% no tratamento com os compostos AZT<sub>1072</sub>, AZT<sub>1079</sub> e AZT<sub>1073</sub>, respectivamente, na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e 8,2% no tratamento com o composto AZT<sub>1072</sub> na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Nas demais concentrações, a indução de apoptose não foi significativa em relação ao controle ( $P > 0,05$ ) (Fig. 1).

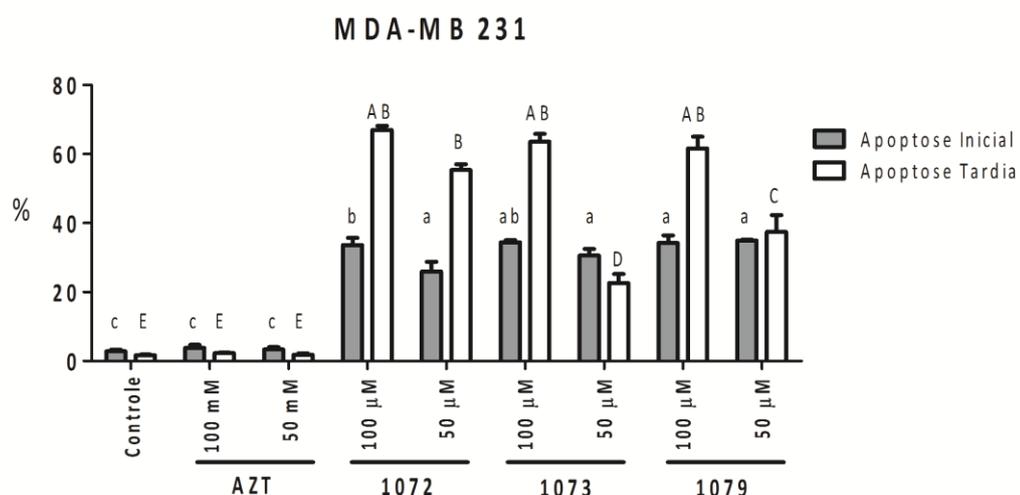
Para as células tumorais, o percentual de células em apoptose inicial [Annexin V-PE (+)/7AAD (-)] foi de 36,6%, 34,4%, 34,2% e 3,8% nos tratamentos com 100  $\mu\text{M}$  de AZT<sub>1072</sub>, AZT<sub>1073</sub>, AZT<sub>1079</sub> e AZT, respectivamente e 25,9%, 30,6%, 34,9% e 3,3% nos tratamentos com 50  $\mu\text{M}$ . O percentual de células em apoptose tardia ou mortas [Annexin V-PE (+)/7AAD (+)] foi de 66,9%, 63,5%, 61,6% e 2% nos tratamentos com 100  $\mu\text{M}$  de AZT<sub>1072</sub>, AZT<sub>1073</sub>, AZT<sub>1079</sub> e AZT, respectivamente e de 55,4%, 22,6%, 37,4% e 1,8% nos tratamentos com 50  $\mu\text{M}$ . Com exceção do AZT, todos os

compostos apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ( $P < 0,05$ ) (Fig.2).

Testes anteriores ainda não publicados demonstraram efeito inibitório destes compostos sobre a proliferação celular coerente com as taxas de indução de apoptose encontradas no ensaio de citometria de fluxo. O composto AZT<sub>1072</sub> foi o que apresentou o resultado mais efetivo na menor concentração, apresentando um percentual de células viáveis de aproximadamente 20% no tratamento com 50  $\mu$ M, o que o torna um agente promissor para a terapêutica do câncer de mama. Entretanto, novos testes tem de ser realizados para elucidar melhor o mecanismo de ação deste composto e as vias de morte celular.



**Figura 2.** Indução de apoptose por AZTs modificados em células de ovário de hamster, linhagem CHO. O composto 1072 foi capaz de induzir apoptose em ambas as concentrações com diferença significativa do controle. Os compostos 1072, 1073 e 1079 induziram apoptose de maneira significativa somente na concentração de 100  $\mu$ M.



**Figura 3.** Indução de apoptose por AZTs modificados em células de linhagem de câncer de mama metastático, MDA-MB-231. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

Foi possível observar que os derivados sintéticos de AZT tiveram atividade apoptótica sobre células tumorais de mama, com baixa ação em células não-tumorais, dos quais o composto AZT<sub>1072</sub> se destacou por apresentar ação na concentração mais baixa, sendo assim um agente terapêutico promissor.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHOW WA, JIANG C, GUAN M. Anti-HIV drugs for cancer therapeutics: back to the future? *The Lancet Oncology*, v. 10, n.1, p. 61-71, 2009.

JI HJ, RHA SY, JEUNG HC, YANG SH, AN SW, CHUNG HC. Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and telomere loss. *Breast Cancer Research Treatment.*, v.93, p. 227–236, 2005.

MODICA-NAPOLITANO JS, NALBANDIAN R, KIDD ME, NALBANDIAN A, NGUYEN CC. The selective in vitro cytotoxicity of carcinoma cells by AZT is enhanced by concurrent treatment with delocalized lipophilic cations. *Cancer Letter*, v. 198, n.1, p. 59-98, 2003.

PRIEGO EM, KARLSSON A, GAGO F, CAMARASA MJ, BALZARINI J, PÉREZ-PÉREZ MJ. Recent advances in thymidine kinase 2 (TK2) inhibitors and new perspectives for potential applications. *Current Pharmaceutical Design*, v. 18, n. 20, p. 2981-94, 2012.

SCRUGGS, E.R.; DIRKS NAYLOR, A.J. Mechanisms of zidovudine-induced mitochondrial toxicity and myopathy. *Pharmacology*, v.82, n.2, p.83-8, 2008.

WAGNER, C.R.; BALLATO, G.; AKANNI, A.O.; MCLNTEEE, 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.

WEBER, G.; ICHITAWA, S.; NAGAI, M.; NATSUMEDA, Y. Azidothymidine inhibition of thymidine kinase and synergistic cytotoxicity with methotrexate and 5-fluorouracil in rat hepatoma and human colon cancer cells. *Cancer Communications*, v.2, p.129–133, 1990.