

EFEITO ANTINEOPLÁSICO E SINÉRGICO DE PIRAZÓIS E DOXORRUBICINA EM LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

JULIETI H. BUSS^{1,3}; JOSIANE TESSMANN^{2,3}; ROSIANE M. MARTINS^{2,3};
CLÁUDIO M. PEREIRA³; TIAGO V. COLLARES^{1,2,3}; FABIANA K. SEIXAS^{1,2,3}

¹Universidade Federal de Pelotas – GBiotecnologia – julietibuss@hotmail.com

²PPGBiotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

³Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular – Laboratório de Biotecnologia do Câncer
seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma neoplasia heterogênea caracterizada como o tipo mais comum entre as mulheres no mundo, afetando 1,8 milhões de mulheres por ano (MARTIN et al., 2014). Dentre os subtipos existentes, o triplo negativo, caracterizado pela ausência de receptores hormonais e receptores HER2 em suas células, representa o subtipo de pior prognóstico devido à sua rápida resistência aos medicamentos e ausência de alvo terapêutico específico (VYAS et al., 2016), sendo a quimioterapia a abordagem terapêutica utilizada para este tipo de câncer.

A Doxorrubicina (DOX) é um agente quimioterápico pertencente à classe das antraciclinas amplamente utilizado para o tratamento de câncer de mama. Entretanto, apesar de ser um dos mais efetivos agentes antitumorais, sua aplicação terapêutica é limitada devido aos seus efeitos adversos como cardiotoxicidade e toxicidade hematológica (WU et al., 2013).

Dessa maneira, estudos visando à descoberta de novos agentes com potenciais antitumorais, que possibilitem a combinação com terapias convencionais visando à redução da dose e consequentemente toxicidade terapêutica apresentam-se de grande relevância no contexto científico.

Neste sentido, compostos pirazólicos tem despertado o interesse da comunidade acadêmica devido ao potencial antineoplásico já relatado na literatura (EL-KARIM et al., 2015; REDDY et al., 2015). Pirazóis são compostos heterocíclicos de 5 membros, com 2 nitrogênios ocupando as posições 1 e 2. Os mecanismos de ação antitumoral desses compostos e de seus derivados envolvem a interrupção do ciclo celular, inibição da migração e invasão tumoral, autofagia e apoptose (ZHANG et al., 2015).

Devido à importância farmacológica que os pirazóis apresentam, o objetivo do presente estudo foi de avaliar a capacidade antitumoral de uma classe de pirazóis isoladamente e em associação com DOX, em linhagem celular de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231).

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese dos pirazóis

A síntese dos pirazóis **2a-d** foi realizada com base na metodologia reportada por PIZZUTI et al. (2009) e compreende as estruturas abaixo:

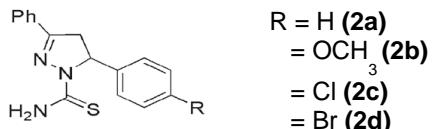


Figura 1: Estrutura dos pirazóis **2a-d** sintetizados.

2.2. Cultivo Celular

As células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio

de Janeiro, RJ, Brasil) foram cultivadas em meio Leibovitz's L-15 Medium® suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 0,2mg/mL de bicarbonato de sódio, a 37°C e 95% de umidade. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

2.3. Ensaio colorimétrico de MTT

A determinação da citotoxicidade dos pirazóis **2a-d** foi avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT, o qual avalia a atividade metabólica das células viáveis na redução do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, de coloração amarela em cristais de formazan de cor azul-púrpura, no qual seus valores de absorbância determinam a porcentagem de células vivas, através de leitura a 492nm.

Para a realização desse ensaio, as células foram semeadas a uma densidade de 2×10^4 em placas de 96 poços. Após 24h, as células foram tratadas com os pirazóis **2a-d** nas concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80 μ M por 24, 48 e 72h. As moléculas **2c** e **2d**, que demonstraram os melhores resultados nesse ensaio, foram combinadas nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M com 0,5, 1 e 2 μ M de DOX por 48h. A porcentagem de inibição do crescimento foi determinada através da fórmula: % de inibição = (1- Abs₄₉₂ células tratadas/Abs₄₉₂ células controles) × 100.

2.4. Efeito das combinações

O efeito das combinações de tratamento foi avaliado através do índice de combinação (IC), amplamente utilizado para determinar a ação múltipla de compostos com base na equação de CHOU-TALALAY (2010). Valores de ICs <0,9 indicam sinergismo, valores de 0,9-1 indicam interação aditiva, e ICs > 1 indicam antagonismo.

2.5. Ensaio de Live/Dead®

O ensaio Live/Dead® (Invitrogen™) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Para a realização desse ensaio, as células foram tratadas com as concentrações de 10 μ M de **2c** e **2d** e 0,5 μ M de DOX, ambos isolados e combinados por 48h. As imagens foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência Olympus IX71 (Olympus Optical Co) e analisadas utilizando o programa Cell^F software (Cell-F, EUA).

2.6. Análise de apoptose

A análise de apoptose foi realizada através da coloração de regiões do DNA por DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, di-hidrocloreto, Invitrogen). Para a realização desse ensaio, as células foram tratadas nas concentrações de 10 μ M de **2c** e **2d**, 0,5 μ M de DOX, ambos isolados e combinados por 48h. Os resultados foram analisados através de microscópio de fluorescência, Olympus IX71 (Olympus Optical Co) por imagem multicolor. As imagens obtidas foram analisadas usando o software Cell-F (M-celular, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do ensaio citotóxico demonstraram alto potencial antitumoral dos pirazóis sintetizados. O efeito inibitório demonstrado foi dose dependente para todas as moléculas. Além disso, os pirazóis com substituinte cloro (**2c**) e bromo (**2d**) apresentaram efeito antiproliferativo superior (IC₅₀ 19,86 e 31,05 μ M, respectivamente) quando comparados aos pirazóis (**2a**) e (**2b**) (IC₅₀ 97,38 e 47,67 μ M, respectivamente).

Nossos dados estão de acordo com a literatura, uma vez que já é reportado que pirazóis com átomos halogênicos, como **2c** e **2d**, exibem atividades citotóxicas mais potentes quando comparados a outros substituintes (FOROUZANFAR et al., 2011). Portanto, as moléculas **2c** e **2d** foram

selecionadas para os testes de combinação com a DOX e os resultados desse ensaio são apresentados na Figura 2.

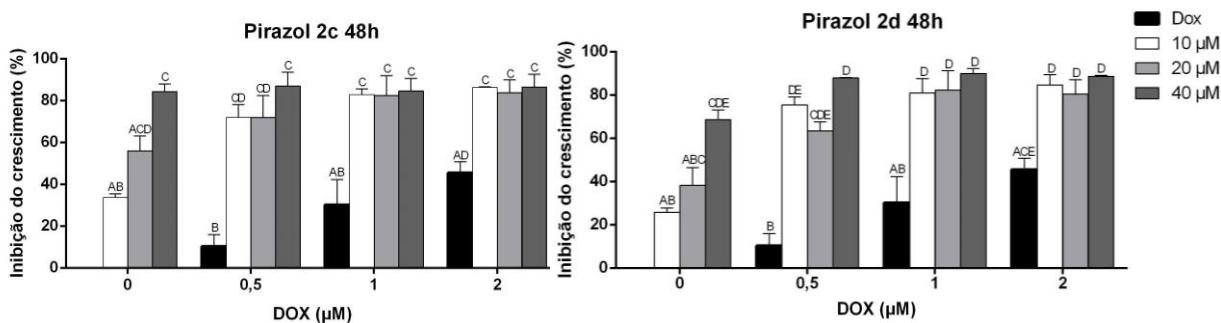


Figura 2: Efeito antiproliferativo do tratamento combinado dos pirazóis **2c** e **2d** com DOX frente à linhagem MDA-MB-231 após 48h de exposição. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos de tratamento. Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos.

O efeito inibitório das combinações, já nas menores concentrações, foi significativamente maior quando comparado ao efeito inibitório dos isolados. Na concentração de 10 μ M os pirazóis sozinhos, **2c** e **2d**, foram capazes de inibir 33,67% e 25,79%, respectivamente. A DOX sozinha na concentração de 0,5 μ M foi capaz de inibir apenas 10,32% das células, enquanto em combinação com 10 μ M dos pirazóis **2c** e **2d**, esse efeito foi potencializado, exibindo uma taxa de inibição de respectivamente 71,94% e 75,48%.

Os valores de ICs demonstraram que, nas concentrações de 10 e 20 μ M, os pirazóis **2c** e **2d** exibiram efeito sinérgico quando combinados com todas as concentrações de DOX testadas. Para a concentração de 40 μ M o pirazol **2c** apresentou efeito sinérgico combinado com 0,5 μ M de DOX, enquanto que o pirazol **2d**, apresentou efeito sinérgico nas concentrações de 0,5 e 1 μ M de DOX.

Os resultados dos valores dos índices de combinação (ICs) indicam que o sinergismo foi mais evidente nos tratamentos com as menores concentrações dos combinados, sugerindo que a combinação de DOX, em certas concentrações, com as moléculas **2c** e **2d** possibilitaria a redução da dose e consequentemente redução da sua toxicidade (SUN et al., 2014).

Os resultados obtidos no ensaio de Live/Dead® comprovam que os pirazóis **2c** e **2d** tiveram a capacidade de potencializar a citotoxicidade da DOX, já que demonstraram diminuição significativa da viabilidade celular nas combinações de tratamento com as moléculas **2c** (24,11%) e **2d** (29,12%), quando comparadas a viabilidade induzida pela DOX isolada (9,72%).

Além disso, o ensaio de coloração com DAPI (Figura 3) demonstrou um aumento significativo de células apoptóticas nas combinações de tratamento com as moléculas **2c** (32,69%) e com **2d** (35,92%) em relação a indução de apoptose de DOX isolada (8,8%). A coloração com DAPI é marcadora de células com núcleos reduzidos e condensados, processo típico de apoptose (KAVANAGH et al., 2003).

A capacidade de indução de apoptose por compostos pirazólicos já é relatada na literatura (REDDY et al., 2015) e acredita-se que esse processo ocorra pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumento da expressão de genes pró-apoptóticos e ativação de caspases (ZHANG et al., 2015 e REDDY et al., 2015).

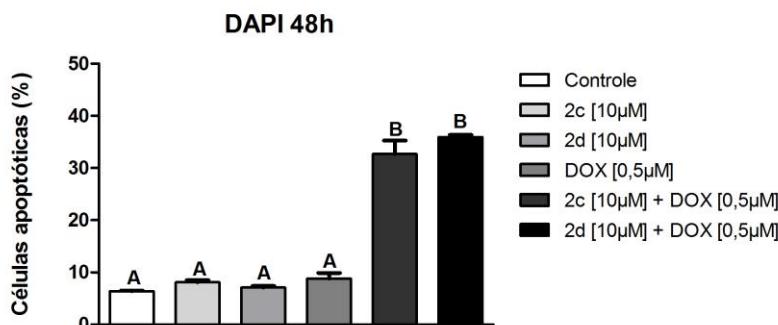


Figura 3: Ensaio de coloração com DAPI do tratamento combinado dos pirazóis **2c** e **2d** com DOX frente à linhagem MDA-MB-231 após 48h de exposição. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos de tratamento. Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos.

4. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos, podemos concluir que os pirazóis **2c** e **2d** exibiram significativa atividade antitumoral frente à linhagem de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231. Além disso, quando combinados com DOX, potencializaram o seu efeito e apresentaram efeito sinérgico com significativo potencial antineoplásico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHOU, TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Res**, v.70, n.2, p. 440-446, 2010
- DINESH, VYAS.; KAIVALYA, DESHPANDE.; LAKSHMISHANKAR, CHATURVEDI.; LAPUT, GERIC.; KAREN, CHING. Rapid Extensive Recurrence of Triple Negative Breast Cancer: Are Both Therapy and Cancer Biology the Culprit? **J Clin Med Res**, v.8, n.2, p.162-167, 2016.
- EL-KARIM, SS.; ANWAR, MM.; MOHAMED, NA.; NASR T. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel benzofuran-pyrazole derivatives as anticancer agents. **Bioorg Chem**, v.63, p.1-12, 2015.
- FOROUZANFAR, MH.; FOREMAN, KJ.; DELOSSANTOS, AM.; LOZANO, R.; LOPEZ, AD.; MURRAY, CJ. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. **Lancet**, v.328, p.1461-1484, 2011.
- HU, W.; KAVANAGH, J. J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **Lancet Oncol.**, v.4, p.721-729, 2003.
- MARTIN, HL.; SMITH, L.; TOMLINSON, DC. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives, p.1–13, 2014.
- PIZZUTI, L.; PIOVESAN, LA.; FLORES, AF.; QUINA, FH.; PEREIRA, CM. Environmentally friendly sonocatalysis promoted preparation of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles. **Ultrason Sonochem**, v.16, p.728-31, 2009.
- REDDY, TS.; KULHARI, H.; REDDY, VG.; BANSAL, V.; KAMAL, A.; SHUKLA, R. Design, synthesis and biological evaluation of 1,3-diphenyl-1H-pyrazole derivatives containing benzimidazole skeleton as potential anticancer and apoptosis inducing agents. **Eur J Med Chem**, v.101, p.790-805, 2015.
- WU, G.; LU, J.; GUO, J. Synergistic anti-cancer activity of the combination of dihydroartemisinin and doxorubicin in breast cancer cells, p.453–459, 2013.
- ZHANG, CH.; ZHENG, MW.; LI, YP.; LIN, XD.; HUANG, M.; ZHONG, L. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Studies of 3-(Phenylethynyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine Derivatives as a New Class of Src Inhibitors with Potent Activities in Models of Triple Negative Breast Cancer. **J Med Chem**, v.58, p.3957-74, 2015.