

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E APOPTÓTICO DE CHALCONAS DERIVADAS DO 2-ACETILTIOFENO EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

VICTORIA MASCARENHAS BORBA¹; ROSIANE MASTELARI MARTINS¹;
CAROLINE CARAPINA²; CLAUDIO M. PEREIRA²; TIAGO COLLARES¹;
FABIANA KÖMMLING SEIXAS^{1,2}

¹Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO) - Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – victoriamborba2@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama afeta 1,38 milhões de mulheres em todo o mundo por ano (MARTIN et al., 2014). No Brasil, em 2013, esse tipo de câncer foi responsável por 14.388 mortes, sendo 181 homens e 14.206 mulheres e a estimativa de novos casos para 2016 é de 57.960 (INCA, 2016).

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) é um subgrupo de tumores que não expressa níveis significativos de receptores de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2). Este tipo de câncer é responsável por aproximadamente 15 - 20% dos casos de câncer de mama e é frequentemente um tumor agressivo quando comparado a outros cânceres de mama, uma vez que tende a crescer mais rapidamente com alta taxa de metástase e recidivas (LOPES et al., 2015). Em geral, CMTN está associado a um pior prognóstico e parte da razão para isso está associada à falta de tratamentos específicos para esse tipo de câncer (LOPES et al., 2015). Nesse contexto, a busca por compostos mais seletivos e com maior potência terapêutica é de extrema relevância no contexto científico mundial.

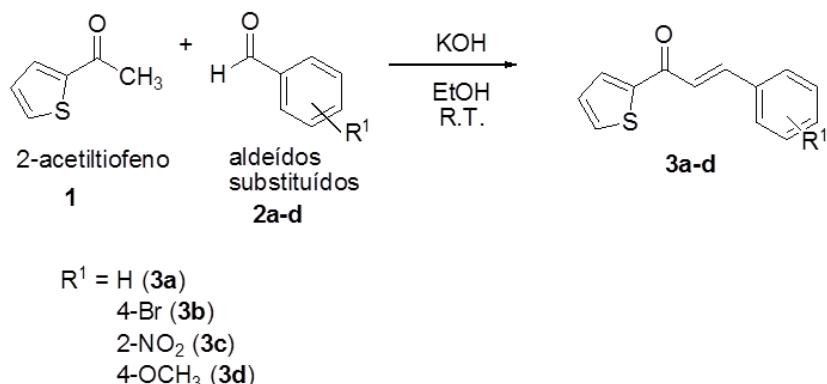
Chalconas são cetonas α,β -insaturadas com um anel aromático ligado a carbonila e outro ligado a insaturação. Estas moléculas são encontradas em produtos naturais ou obtidas por processos sintéticos. A literatura tem reportado importantes atividades biológicas em chalconas e seus derivados diversamente substituídos, como anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antiparasitária, entre outras (VASCONCELOS et al., 2013; RITTER et al., 2015).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem estudando novas estratégias terapêuticas *in vitro* contra várias linhagens de células tumorais (VASCONCELOS et al., 2013; BEGNINI et al., 2014; SCHULTZE et al., 2014). Como seguimento dos nossos estudos nesta área, e tendo em vista o potencial farmacoterapêutico de diferentes chalconas, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar uma classe de chalconas e avaliar o potencial citotóxico e apoptótico dessas moléculas em células de câncer de mama humano triplo negativo (linhagem MDA-MB-231).

2. METODOLOGIA

2.1 Síntese das Chalconas

As chalconas foram sintetizadas a partir do 2-acetiltiofeno, de acordo com metodologia previamente reportada pelo nosso grupo de pesquisa (VASCONCELOS et al., 2013) – Figura 1.

**Figura 1-** Síntese das Chalconas **3a-d**

2.2 Linhagem Celular

A linhagem celular de câncer de mama humano triplo negativo (MDA-MB-231) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cultivada em meio Leibovitz suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,2 mg/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 Determinação da Citotoxicidade

2.3.1 Ensaio de redução do MTT

O potencial citotóxico das chalconas foi avaliado através do ensaio colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Nesse ensaio, MTT de coloração amarela é reduzido a cristais de formazan de cor azul-púrpura pelas células viáveis. As células foram tratadas com 5 a 80 μM das diferentes chalconas e a citotoxicidade foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos. Como controle negativo foram utilizados poços com células sem tratamento. A porcentagem de inibição do crescimento foi determinada através da fórmula: % de inibição = $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ células tratadas}/\text{Abs}_{492} \text{ células controles}) \times 100$.

2.3.2 Ensaio LIVE/DEAD®

O ensaio LIVE/DEAD (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) consiste em um kit comercial que utiliza corantes fluorescentes capazes de diferenciar células vivas e mortas. As células foram tratadas com 20 μM das diferentes chalconas e a citotoxicidade foi avaliada após 24 horas de exposição aos tratamentos. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência. Células vivas são capazes de internalizar a calceína e podem ser visualizadas por emissão de luz fluorescente verde (488 nm) enquanto células mortas podem ser visualizadas pelo sinal fluorescente vermelho (546 nm), uma vez que o homodímero de brometo de etídio difunde-se através da membrana permeável de células mortas e liga-se ao DNA.

2.3.3 Ensaio de Coloração DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

O efeito apoptótico das moléculas sintetizadas foi investigado através do ensaio de coloração por DAPI. O corante DAPI possui baixa permeabilidade em células viáveis e alta permeabilidade em células apoptóticas, resultando em alta fluorescência e possibilitando a visualização das alterações nucleares. As células

MDA-MB-231 foram tratadas com 20 μ M das diferentes chalconas e as taxas de apoptose avaliadas após 24 horas de exposição aos tratamentos. Controle não tratado e controle tratado com 2 μ M de doxorrubicina foram incluídos. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência e analisadas no software Cell^F (Cell-F, Nova Iorque, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que as quatro chalconas sintetizadas apresentam alta citotoxicidade contra a linhagem celular de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), inibindo 50% da viabilidade celular em concentrações que variam de $5,52 \pm 4,26$ a $31,99 \pm 1,77 \mu$ M após 48 h de tratamento (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de IC_{50} (μ M) das chalconas **3a-d** sobre a linhagem MDA-MB-231 após 48h de exposição aos tratamentos.

Chalcona	IC_{50}
3a	$22,10 \pm 7,28$
3b	$22,30 \pm 3,50$
3c	$5,52 \pm 4,26$
3d	$31,99 \pm 1,77$

O efeito citotóxico foi confirmado pelos ensaios fluorimétricos. As imagens obtidas pelo ensaio LIVE/DEAD demonstram um aumento de células mortas (fluorescência vermelha) após o tratamento com as diferentes chalconas quando comparado ao controle não tratado. Além disso, uma redução no número total de células pode claramente ser observado após os tratamentos.

A coloração por DAPI demonstrou que as chalconas **3b** e **3c** são capazes de induzir a apoptose em células MDA-MB-231 (27% e 47%, respectivamente) em comparação ao controle não tratado (Figura 2). Além disso, a chalcona **3c** demonstrou uma maior taxa de apoptose em comparação ao fármaco padrão doxorrubicina.

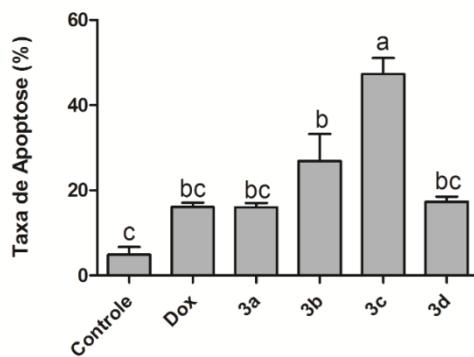


Figura 2 – Porcentagem de células apoptóticas após 24h de exposição à de 20 μ M das diferentes chalconas. Diferentes letras indicam diferença significativa entre os diferentes tratamentos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos e os dados foram expressos como média \pm EPM.

A apoptose induzida por chalconas pode resultar de vários acontecimentos celulares incluindo alterações mitocondriais, alterações no metabolismo oxidativo e no conteúdo celular de ATP, bem como aumento da expressão de genes apoptóticos (VASCONCELOS et al., 2013).

Mizuno et al. (2010) relataram que chalconas com grupos retiradores de elétrons no anel benzênico, como átomos de halogênio, hidroxila ou nitro, tinham as maiores atividades inibitórias contra células de carcinoma do cólon. Nossos achados estão de acordo com esse relato, uma vez que as chalconas com substituintes retiradores de elétrons, como **3b** e **3c**, também demonstraram os maiores efeitos apoptóticos. Em um estudo anterior, nosso grupo demonstrou o potencial citotóxico e apoptótico dessas mesmas chalconas em células de adenocarcinoma de cólon humano (VASCONCELOS et al., 2013).

A busca por novos compostos mais seletivos, com menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência é de extrema relevância no tratamento de CMTN. Nossos resultados indicam que as chalconas **3a-d** podem representar uma potencial ferramenta terapêutica nessa área.

4. CONCLUSÕES

No presente estudo, quatro chalconas derivados de 2-acetiltiopheno inibiram significativamente a viabilidade das células de câncer da mama humano triplo negativo *in vitro*. Além disso, nossos resultados indicaram que 2 das moléculas sintetizadas são capazes de induzir morte celular por apoptose. Apesar de ser um estudo inicial, nossos dados indicam que as chalconas estudadas podem representar uma fonte potencial de agentes terapêuticos para o câncer da mama triplo negativo. Dessa forma, mais pesquisas devem ser realizadas para explorar o potencial bioativo dessas moléculas a fim de garantir a sua aplicação como potenciais ferramentas terapêuticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEGNINI, K. et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer 2016. Acessado em 15 mai. 2016. Online. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>.
- LOPES, C. et al. Clinical, histomorphological, and therapeutic prognostic factors in patients with triple-negative invasive breast cancer. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 6, p. 397-406, 2015.
- MARTIN, L.; SMITH, L.; TOMLINSON, D. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 6, p. 1-13, 2014.
- MIZUNO, C. et al. Synthesis and biological evaluation of retinoid-chalcones as inhibitors of colon cancer cell growth. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 24, p. 7385-7387, 2010.
- RITTER, M.; MARTINS, R. M.; ROSA, S. A.; MALAVOLTA, J. L.; LUND, R. G.; FLORES, A. F.; PEREIRA, C. M. Green Synthesis of Chalcones and Microbiological Evaluation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1201-1210, 2015.
- SCHULTZE, E. et al. Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p. 55-63, 2014.
- VASCONCELOS A.; CAMPOS V. F.; NEDEL F.; SEIXAS F. K.; DELLAGOSTIN O. A.; SMITH K. R.; DE PEREIRA C. M.; STEFANELLO F. M.; COLLARES T.; BARSCHAK A. G. Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. **Cell biochemistry and function**, v. 31, n. 4, p. 289-297, 2013.