

COMBINAÇÃO DE CHALCONAS DERIVADAS DO 2-ACETILTIOFENO COM DOXORRUBICINA NO TRATAMENTO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO

ROSIANE MASTELARI MARTINS^{1,2}; KARINE BEGNINI¹; VICTORIA MATHIAS¹; MARINA RITTER²; FABIANA K. SEIXAS¹; CLAUDIO M. P DE PEREIRA²

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

²Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil –
claudiochemistry@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama afeta 1,38 milhões de mulheres em todo o mundo por ano, tornando-se a causa mais comum de morte por câncer entre as mulheres, especialmente nos países menos desenvolvidos (RAU et al., 2015). No Brasil, a estimativa de novos casos para 2016 é de 57.960 (INCA, 2016).

A doxorubicina (DOX) é um antibiótico glicosídico pertencente ao grupo das antraciclinas amplamente utilizada como agente quimioterápico para câncer de mama. No entanto, apesar de sua alta atividade anticancerígena, sua utilização terapêutica na prática é limitada pela sua toxicidade, principalmente a cardiotoxicidade (DAMIANI et al., 2016). Dessa forma, o tratamento combinado com outros medicamentos para reduzir a sua concentração e toxicidade é desejável.

Chalconas são cetonas α,β -insaturadas com um anel aromático ligado a carbonila e outro ligado a insaturação. Essas moléculas são extremamente versáteis devido a possibilidade de variações estruturais nos anéis aromáticos, que podem conter ou não heteroátomos em sua estrutura, bem como diferentes substituintes (RITTER et al., 2014; RITTER et al., 2015).

A literatura tem reportado importantes atividades biológicas em chalconas e seus derivados diversamente substituídos, como anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antiparasitária, entre outras (RITTER et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2012). Devido à importância dessas propriedades farmacológicas, nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido estudos relacionados à síntese de chalconas e seus derivados (VASCONCELOS et al., 2012; RITTER et al., 2014; RITTER et al., 2015).

Tendo em vista a importância de estudos na área da terapêutica do câncer de mama e, em continuação aos nossos estudos relacionados a chalconas e derivados, o objetivo do presente estudo foi sintetizar uma classe de chalconas derivadas no 2-acetiltiofeno e determinar os efeitos da combinação dessas moléculas com DOX no tratamento de células de câncer de mama humano.

2. METODOLOGIA

2.1 Síntese das Chalconas

Para síntese das chalconas **3a-d** (Figura 1), uma solução de hidróxido de potássio (5%, 10 ml) foi adicionada a uma mistura de 2-acetiltiofeno (0,01 mol) e diferentes benzaldeídos substituídos (0,01 mol) em etanol (50 ml). A mistura foi agitada durante 6h. O sólido precipitado foi filtrado, lavado com água, seco e recristalizado a partir de etanol. As estruturas das moléculas sintetizadas foram confirmadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS).

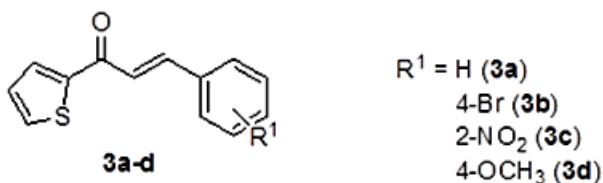


Figura 1- Estruturas das chalconas sintetizadas

2.2 Determinação da Citotoxicidade

O potencial citotóxico das chalconas aplicadas isoladamente e em combinação com DOX foi avaliado através do ensaio colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em linhagem celular de câncer de mama humano (MCF-7). Nesse ensaio, MTT de coloração amarela é reduzido a cristais de formazan de cor azul-púrpura pelas células viáveis. As células foram tratadas com 0,5; 1 e 2 μM de DOX, com 10; 20 e 40 μM das diferentes chalconas e com combinações dessas concentrações de tratamento. A citotoxicidade foi avaliada após 24 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 = $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ células tratadas} / \text{Abs}_{492} \text{ células controles}) \times 100$ (VASCONCELOS et al., 2012).

2.3 Efeito das Combinações

O efeito das combinações de tratamentos foi avaliado através do índice de combinação (CI). O CI é amplamente utilizado para quantificar o sinergismo entre drogas com base na equação de Chou-Talalay (2010): $\text{CI} = (\text{D1}) / (\text{DX1}) + (\text{D2}) / (\text{DX2})$, onde D1 e D2 são as concentrações utilizadas de DOX e da chalcona em combinação e DX1 e DX2 são as concentrações dessas moléculas que quando utilizadas isoladamente apresentam o mesmo efeito obtido na combinação dos tratamentos. Dessa forma, $\text{CI} < 0,9$ indica sinergismo, $\text{CI} = 0,9-1,10$ indica efeito aditivo, e $\text{CI} > 1,10$ indica antagonismo.

2.4 Concentração Intracelular de DOX

As células MCF-7 foram pré-cultivados durante 12h com 20 e 40 μM das diferentes chalconas e posteriormente tratadas com 2 μM de DOX por 1 h. As células foram então lavadas e ressuspensas em 1 ml de PBS. Posteriormente, a concentração intracelular de DOX foi avaliada por citometria de fluxo através das intensidades de fluorescência emitidas por DOX.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As chalconas foram sintetizadas com rendimentos entre 60 e 88,7% e alto grau de pureza (96 a 100%). O ensaio de citotoxicidade demonstrou alta atividade antiproliferativa das chalconas. Na concentração de 40 μM as chalconas **3a-d** foram capazes de inibir respectivamente 73,92; 78,32, 80,57 e 50,24% do crescimento celular após 24h de exposição aos tratamentos (**Figura 2**).

DOX na concentração de 2 μM foi capaz de inibir 32,23% do crescimento das células; por outro lado, em combinação com 40 μM das chalconas **3a-d**, esse efeito foi potencializado e as inibições do crescimento foram de respectivamente 67,75; 64,65; 84,20 e 44,86% (**Figura 2**).

O efeito das combinações de tratamentos avaliado pelos valores dos índices de combinação demonstraram que as chalconas **3b** e **3d** exibiram efeito sinérgico ($\text{CI} < 0,9$) nas combinações de 10 e 20 μM das chalconas com 0,5 e 1 μM de DOX;

enquanto um efeito sinérgico foi observado na combinação de 40 μ M da chalcona **3c** com 2 μ M de DOX.

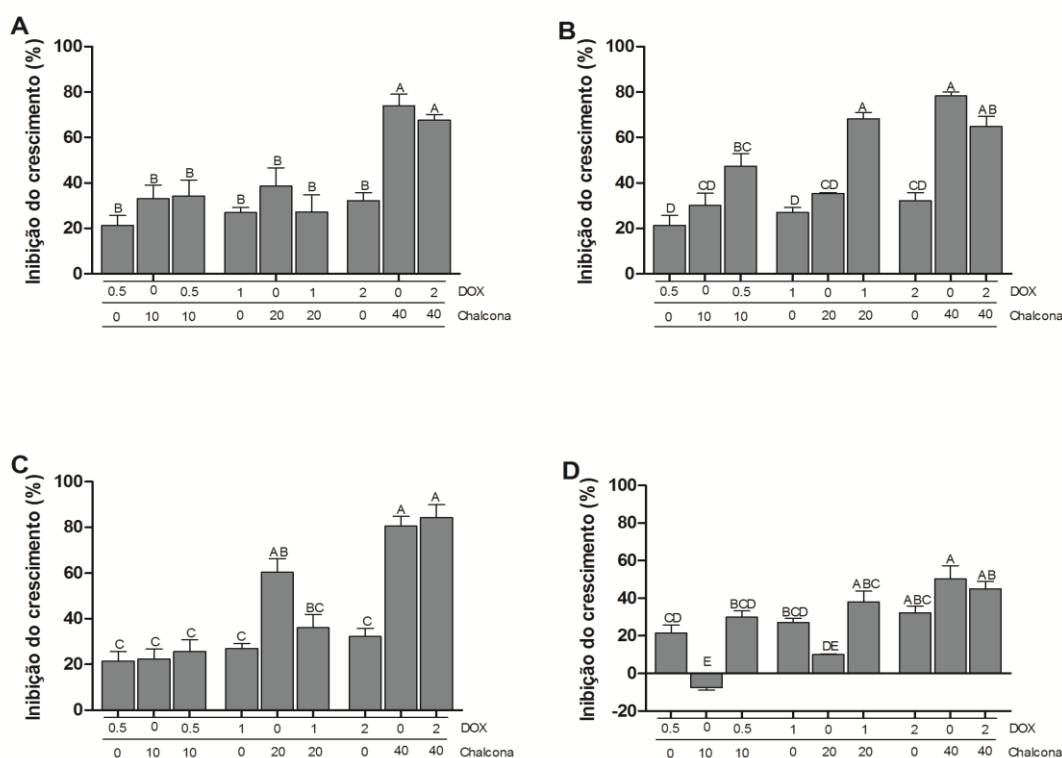


Figura 2. Inibição do crescimento (%) das células MCF-7 tratadas com DOX e com as chalconas **3a** (A), **3b** (B), **3c** (C), **3d** (D) isoladamente e em combinação após 24h de exposição aos tratamentos. Os dados são expressos como Média \pm EPM. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos de tratamento. $P < 0,05$ foram considerados significativos (teste Tukey).

O potencial anticancer de diferentes chalconas tem sido demonstrado em diferentes linhagens tumorais (KETABLOROOSH et al., 2014; KUMAR et al., 2014). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou o efeito antitumoral das chalconas **3a-d** em células de adenocarcinoma de cólon (VASCONCELOS et al., 2012). Os principais mecanismos relatados são alterações mitocondriais; alterações no metabolismo; expressão alterada de genes apoptóticos e indução de apoptose (KETABLOROOSH et al., 2014; KUMAR et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2012). Além disso, a literatura tem reportado que algumas classes de chalconas podem aumentar a concentração intracelular de DOX (ALY et al., 2011).

Para avaliar se o efeito sinérgico observado na combinação com chalconas estaria associado a um aumento da concentração intracelular de DOX, as concentrações intracelulares desse quimioterápico foram analisadas com e sem pré-tratamento com as diferentes chalconas. Verificou-se que a intensidade de fluorescência das células tratadas com DOX foi significativamente mais elevada em relação ao grupo controle sem tratamento. No entanto, a intensidade de fluorescência no tratamento combinado foi idêntica ao grupo tratado apenas com DOX, indicando que o pré-tratamento com as chalconas **3a-d** não influenciaram na concentração intracelular de DOX.

Apesar da efetividade de DOX na terapêutica do câncer, o tratamento com esse quimioterápico pode ocasionar efeitos cardiotoxicos (DAMIANI et al., 2016). Nossos resultados demonstraram que as chalconas **3a-d** podem potencializar o efeito

de DOX quando utilizadas em combinação, o que poderia reduzir a sua dose de administração e consequentemente seus efeitos tóxicos.

4. CONCLUSÕES

As chalconas estudadas demonstraram potencial citotóxico *in vitro* sobre a linhagem de câncer de mama humano MCF-7 e atuaram de forma sinérgica com DOX em determinadas concentrações, sem influenciar na concentração intracelular desse quimioterápico. Ainda que preliminares, nossos resultados indicam que a combinação com chalconas pode aumentar a eficácia terapêutica de DOX, o que poderia reduzir a sua dose de administração e consequentemente seus efeitos cardiotóxicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALY, M.R.; IBRAHIM, EL-SI.; EL SHAHED, F.A.; SOLIMAN, H.A.; IBRAHIM, Z.S.; EL-SHAZLY, SA. Synthesis of some quinolinyl chalcone analogues and investigation of their anticancer and synergistic anticancer effect with doxorubicin. **Bioorganicheskaya khimiya**, v. 38(4), p. 489-95, 2012.
- CHOU, TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer research**, v. 70 (2), p. 440-446, 2010.
- DAMIANI, R. M., MOURA, D. J., VIAU, C. M., CACERES, R. A., HENRIQUES, J. A. P., SAFFI, J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. **Archives of Toxicology**, 1-14, 2016.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer 2016. Acessado em 01 ago. 2016. Online. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>.
- KETABFOROOSH, S.H.; KHEIROLLAHI, A.; SAFAVI, M. ESMATI, N.; ARDESTANI, S.K.; EMAMI, S.; FIROOZPOUR, L.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Synthesis and anti-cancer activity evaluation of new dimethoxylated chalcone and flavanone analogs. **Archiv der Pharmazie (Weinheim)**, v. 347(11), p. 853-60, 2014.
- KUMAR, D., RAJ, K. K., MALHOTRA, S. V., RAWAT, D. S. Synthesis and anticancer activity evaluation of resveratrol-chalcone conjugates. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 5(4), p. 528-535, 2014.
- RAU, K.; LIN, Y., CHEN, Y.; CHEN, J.; LEE, K.; WANG, C. Pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox ®) combined with cyclophosphamide and 5-fluorouracil is effective and safe as salvage chemotherapy in taxane-treated metastatic breast cancer : an open-label, multi-center, non-comparative phase II study. **BMC Cancer**, v. 15(1), p.1-8, 2015.
- 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 (6), p. 1201-1210, 2015.
- RITTER, M.; MARTINS, R.M.; DIAS, D.; PEREIRA, C.M.P. Recent Advances on the Synthesis of Chalcones with Antimicrobial Activities : A Brief Review. **Letters in Organic Chemistry**, v. 11 (7), p. 498-508, 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.