

TRIAGEM DE COMPOSTOS DERIVADOS DE AZIDOTIMIDINA (AZT) SOBRE A VIABILIDADE DA LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA METASTÁTICO

IZADORA PETER FURTADO¹; VICTORIA MASCARENHAS BORBA²; CLEOMAR DA SILVA²; OSCAR E.D. RODRIGUES³; TIAGO COLLARES⁴, FABIANA K. SEIXAS⁴

¹Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas – izapfurtado@gmail

²Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Santa Maria - LabSelen-NanoBio - Departamento de Química

⁴Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular – Laboratório de Biotecnologia do Câncer – seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Câncer é a nomenclatura dada a um conjunto que constitui mais de cem doenças, as quais têm em comum a característica de crescimento celular desordenado em tecidos e órgãos, que podem acabar se alastrando para demais regiões do corpo. É considerada a segunda principal causa de mortes no mundo e ocasionou a morte de mais de 8 milhões de pessoas em 2015. Sendo assim, é tida como um dos maiores problemas de saúde pública mundialmente (WHO, 2018).

Entre os diversos tipos, o câncer de pele tipo melanoma se caracteriza por se originar e atingir os melanócitos, células especializadas na produção de melanina que se localizam no estrato basal da epiderme. Essas neoplasias têm previsão de crescente incidência nos próximos anos, sendo relatado em torno de 130.000 anualmente no mundo (RASTRELLI, 2014). No Brasil, no ano de 2013, o número de mortes resultantes deste tipo de câncer foi de 1.547, sendo 903 referentes a homens e 644 a mulheres, além das estimativas terem ultrapassado mais de 6.000 novos casos para o ano de 2018 (INCA, 2018).

O diagnóstico é de extrema relevância, pois revela o estadiamento das neoplasias, de forma ser possível designar o tratamento adequado e indicação de prognóstico. Quando a doença atinge camadas mais superficiais da pele e têm menor tamanho, a abordagem cirúrgica é mais utilizada, no entanto quando os danos são maiores e já possuem caráter metastático, radioterapia e quimioterapia são utilizadas, porém com menor eficácia (INGRAFEA, 2013), de modo que a busca por compostos mais eficientes terapeuticamente têm sido foco de diversos estudos.

Nesse contexto, compostos derivados de azidotimidina, caracterizados por serem moléculas de estrutura nucleosídica análogos da timidina, contendo elementos calcogênicos, como selênio e telúrio, têm despertado atenção da comunidade científica por demonstrarem atividades antioxidantes e antitumorais, como relatado na literatura (SOUZA, 2015; ROSA, 2017).

Dessa maneira, tendo em vista o potencial farmacoterapêutico de compostos derivados de AZT organocalcogênicos, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antiproliferativa em linhagem celular de melanoma metastático WM1366.

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese dos derivados de azidotimidina

As moléculas foram sintetizadas e disponibilizadas pelo grupo de pesquisa parceiro LabSelen NanoBio pertencente à Universidade Federal de Santa Maria. Neste estudo foram utilizados os seguintes compostos: molécula de AZT padrão e os derivados 3j (contendo telúrio em sua estrutura) e 3i (contendo enxofre).

2.2. Cultivo Celular

A linhagem celular de melanoma metastático WM1366 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). As células foram mantidas em condições de cultivo controladas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados em triplicata com as células em fase logarítmica de crescimento.

2.3. Ensaio colorimétrico de MTT

Para avaliação da capacidade antiproliferativa dos derivados de AZT, foi realizado o teste de MTT, o qual se baseia 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, de acordo com a atividade metabólica das células viáveis. Neste ensaio os valores de absorbância determinam a porcentagem de células vivas, através de leitura em espectrofotômetro a 492nm. Primeiramente, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células por poço. Passadas 24h, as células receberam como tratamento os compostos AZT padrão, 3j e 3i, nas concentrações 6,25; 12,5; 25; 50 e 100µM e a inibição da proliferação foi avaliada após 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos. Como controle negativo foram utilizados poços contendo células sem receberem tratamento algum, apenas em meio DMEM, e como controle do veículo, poços contendo meio e DMSO na máxima concentração dos compostos testados. A porcentagem de inibição do crescimento foi determinada através da fórmula: % de inibição = $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ células tratadas} / \text{Abs}_{492} \text{ células controles}) \times 100$.

2.4. Análise dos dados

Foi utilizado software Statistix 8. ANOVA, seguido de teste Tukey para múltiplas comparações, em que foram comparados a inibição X tempo e inibição X concentração. $P < 0.05$ foi considerado significativo. A confecção dos gráficos e obtenção dos valores de IC₅₀ foram através do software GraphPad Prism 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados da atividade antiproliferativa dos compostos derivados de azidotimidina demonstrou que quando comparados com a molécula de AZT padrão, o composto 3j apresentou melhores resultados sobre a linhagem de melanoma metastático WM1366. Entre os derivados 3j e 3i, o composto 3j, que contém telúrio em sua estrutura, demonstrou maior atividade antiproliferativa quando comparado com seu análogo, 3i, o qual contém enxofre. Os valores de IC₅₀ foram possíveis de serem calculados apenas para o primeiro, em ambos os tempos de exposição aos tratamentos, variando de 46,55 µM em 24hr e 18,37 µM em 48hr, enquanto que nos demais compostos não obteve-se resultados significativos para cálculo de IC₅₀.

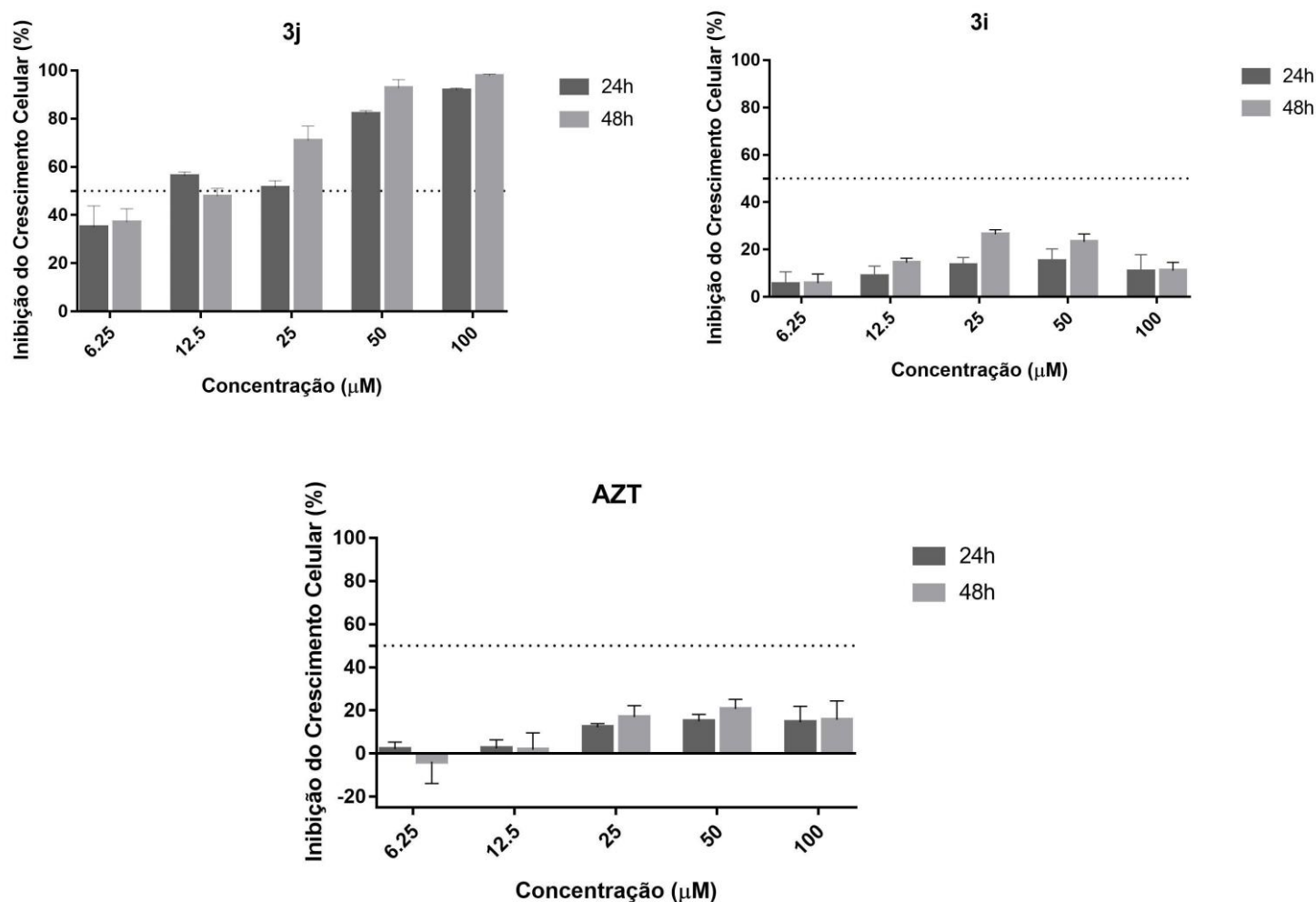


Figura 1: Avaliação da inibição do crescimento celular após tratamento com compostos derivados de AZT em cinco concentrações diferentes nos intervalos de 24 e 48h. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos

Os resultados observados utilizando as moléculas derivadas de AZT contendo elementos calcogênicos demonstram relação com a literatura, a qual faz referência a utilização de compostos dessa natureza e o potencial promissor destes em estudos que avaliaram atividade antioxidante e anti-neoplásica em linhagens celulares de leucemia, carcinoma de bexiga e adenocarcinoma de pulmão (SOUZA, 2015; ROSA, 2017; TABARELLI, 2017). Além disso, também há relatos de estudos com foco na alta capacidade de inibição da viabilidade celular de compostos, tanto orgânicos quanto inorgânicos, contendo telúrio, de modo que células tratadas *in vitro* com essas moléculas sofreram imunomodulação, bem como sofreram apoptose devido a modulação da expressão do gene BCL-2 (SREDNI, 2012; ABONDANZA, 2008)

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que os derivados de azidotimidina contendo elementos calcogênicos são interessantes compostos que demonstraram efeito antiproliferativo sobre a viabilidade de linhagem celular WM1366 de melanoma metastático, com foco principal nos que

contém telúrio em sua estrutura, sinalizando ser uma possibilidade de alternativa terapêutica contra o câncer. Além disso, novos estudos nesta área são de extrema relevância para busca de fármacos mais seletivos e eficientes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abondanza, T. S. Oliveira, C. R. Barbosa, C. M. Pereira, F. E. Caires, A. C. Comasseto, J. V. Queiroz, M. L. Valadares, M. C. Bincoletto, M. C. Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium(IV) compound RT-04. **Food Chem Toxicol.** V.46, n.7, p. 2540-2545, 2008.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, 2017. Online Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 23/08/2018.

INGRAFEA, A.; MELANOMA; *Facial Plast Surg Clin N Am* 21 (2013) 33–42; 2013.

RASTRELLI, M; TROPEA, S; ROSSI, C. R.; ALAIBAC, M.; Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification; *in vivo* 28: 1005-1012 2014.

Rosa, R.M. Piccoli, B.C. Silva, F.D.A. Dornelles, L. Rocha, J.B.T. Sonogo, M.S. Begnini, K.R. Collares, T. Seixas, F.K. O. E. D. Rodrigues. Synthesis, antioxidant and antitumoral activities of 5'-arylchalcogeno-3-aminothymidine (ACAT) derivatives. **Med. Chem. Commun**, v.8, p.408–414, 2017.

Souza, D. Mariano, D.O.C. Nedel, F. Schultze, E. Campos, V.F. Seixas, F. Silva, R.F. Munchen, T.S. Ilha, V. Dornelles, L. Braga, A.L. Rocha, J.B.T. Collares, T. Rodrigues, O.E.D. New Organochalcogen Multitarget Drug: Synthesis and Antioxidant and Antitumoral Activities of Chalcogenozidovudine Derivatives. **J. Med. Chem**, v.58, n.8, p.3329–3339, 2015.

Sredni, B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. **Semin. Cancer Biol.** v.22, n.1, p.60-69, 2012,

Tabarelli, G. Dornelles, L. Iglesias, B.A. Gonçalves, D.F. Stefanello, S.T. Soares, F.A.A. Piccoli, B.C. Silva, F.D.A. Rocha, J.B.T. Schultze, E. Bender, C.B. Collares, T. Seixas, F.K. Peterle, M.M. Braga, A. Rodrigues, O.E.D. Synthesis and Antitumoral Lung Carcinoma A549 and Antioxidant Activity Assays Of New Chiral b-Aryl-Chalcogenium Azide Compounds, **Chemistry Select**, v.2, p.8423 – 8430, 2017.

Tiekink, E. R. Therapeutic potential of selenium and tellurium compounds: opportunities yet unrealized. **Dalton Trans**, v.41, p.6390-6395, 2012.

WHO, World Health Organization, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 23/08/2018.