ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PCPC13

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE NOVOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS

E. D. L. SILVA¹, F. A. SANTOS¹, J. F. BRANCO-JÚNIOR², M.R. GALDINO-PITTA²,
I. R. PITTA^{1,2}, M. G. R. PITTA¹, M. J. B. M. RÊGO¹ e M. C. PEREIRA¹.

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêutica (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Síntese e planejamento de fármacos (LPSF), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

E-mail para contato: eduardo-davi3030@hotmail.com

RESUMO – Os derivados tiazolidínicos vêm destacando no meio científico devido a sua ampla gama de efeitos biológicos, incluindo efeitos anti-inflamatórios e antineoplásicos. O presente estudo avaliou a atividade antineoplásica de alguns derivados tiazolidínicos -LPSF JB-3,4, 5, 6, 7, 8, 14 e 20 frente a PBMC's e diferentes linhagens tumorais. Após o ensaio de citotoxicidade pelo ensaio de MTT, obteve-se valores de viabilidade que não demonstraram citotoxicidade sobre células saudáveis (viabilidade superior a 75%). A partir desse resultado, realizou-se ensaios de citotoxicidade frente a diferentes linhagens neoplásicas - DU-145, PANC-1, TOLEDO, K-562 e T-47D. O derivado LPSF-JB3 foi o único a apresentar resultados promissores nas linhagens DU-145 (IC₅₀ 39,43 µM), PANC-1 (IC₅₀ 35,30 µM) e TOLEDO (IC₅₀ 54,54 µM). Assim o derivado LPSF-JB3 apresentou atividade antineoplásica em potencial reduzindo a viabilidade de células de câncer de próstata e pâncreas.

Palavras-chave: Tiazolidina; anticâncer; PPAR-γ; derivados

ABSTRACT –Thiazolidine derivatives come highlighting prominent scientific world due to its wide range of biological effects, including anti-inflammatory and antineoplastic effects. Present study evaluated activity antineoplastic of some thiazolidine derivatives - LPSF JB-3,4, 5, 6, 7, 8, 14 e 20 front of PBMC's and different lines tumor. After cytotoxicity assay by MTT assay, viability values were obtained which showed cytotoxicity healthy cells (viability higher than 75%). From this result, cytotoxicity assays were performed against different neoplastic lines- DU-145, PANC-1, TOLEDO, K-562 and T-47D. The LPSF-JB3 derivative was the only one to show promising results in the DU-145 (IC 50 39.43 µM), PANC-1 (IC 50 35.30 µM) and TOLEDO (IC 50 54.54 µM) lines. Therefore LPSF-JB3 derivative showed potential antineoplastic activity by reducing viability of prostate and pancreatic cancer cells.

Keywords: Thiazolidine; Anticancer; PPAR-γ; derivatives

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pela descontrolada multiplicação e pela redução da diferenciação celular. É considerado pela Organização Mundial da Saúde como um grave problema de saúde pública em todo o planeta (WHO, 2014). Estima-se que, devido ao envelhecimento da população e ao aumento da exposição a fatores de risco, como a má alimentação, tabagismo e sedentarismo, cerca de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes decorrentes irão ocorrer até o ano de 2030. Neste contexto é de extrema importância o investimento no desenvolvimento de novos métodos terapêuticos como forma de prevenir estes números (Ministério da Saúde, 2014). As tiazolidina-2,4-dionas (TZD) representam uma classe de compostos derivados do anel tiazolidínico e são conhecidas devido a sua atuação como agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) (Cariou, Charbonnel e Staels, 2012; Da Rocha Júnior et al, 2013). Os agonistas do PPAR- λ podem se tornar uma alternativa para o tratamento do câncer, uma vez que sua atuação nos receptores das células neoplásicas estimula a expressão de proteínas antiproliferativas e antiangiogênicas. Não se conhece bem o seu mecanismo de ação, mas sabe-se que as tiazolidinas são capazes de induzir a morte por apoptose em células neoplásicas, além de promover o arrasto do seu ciclo celular (Asati *et al.*, 2014). Neste contexto, o presente projeto buscou avaliar a atividade antineoplásica de novos derivados Tiazolidínicos frente a diferentes tipos de linhagens neoplásicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Derivados

Os derivados Tiazolidínicos estudados no presente trabalho foram sintetizados pelo LPSF – Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, localizado no prédio da DINE e gentilmente cedidos pelo prof Ivan da Rocha Pitta. Os seguintes compostos foram avaliados LPSF JB-3, 6, 8, 14 e 20.

2.2 Comitê de Ética

O Projeto foi previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, sob o CEP: 1.064.387, em nome da Prof. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti, do Departamento de Energia Nuclear.

2.3 Coleta de sangue e separação de PBMCs

Os voluntários (n = 9), apresentavam idade superior a 18 anos e não exibiam qualquer doença inflamatória. O TCLE (*Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*) foi entregue a cada um dos voluntários. Os voluntários tiveram seu sangue coletado em 2 tubos heparinizados de 9 mL, totalizando um volume de 18 ml por voluntário. As amostras foram separadas individualmente e o sangue total foi depositado sobre Ficoll PaqueTM Plus (*GE HealthcareBio-Sciences*) (1:1) em falcons de 50mL etiquetados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas. Após a centrifugação, foi retirado o anel de PBMCs (Células Mononucleares do Sangue Periférico) entre o plasma e o Ficoll, e transferido para outros falcons etiquetados para que duas lavagens com um tampão fosfato (PBS 1x) fossem realizadas. O precipitado foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco).

2.4 Ensaio de citotoxicidade em células de voluntários sadios

Para o ensaio de citotoxicidade utilizando o método de MTT, as células foram plaqueadas em triplicata em uma concentração de 5×10^5 cel/100µL em placas de 96 poços, com as seguintes condições: 1- poços apenas com células; 2- poços com células tratadas com LPSF/JBs nas concentrações de 10 e 75 µM; 3 – poços contendo células com DMSO 0,1% e 0,2%. 48 horas após a incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, foi adicionado 20 µL da solução de MTT-sal tetrazolium (0,5 mg/ml) e as placas voltaram a estufa por 3 h. Em seguida, foi adicionado 130 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 20% para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro de placa com comprimento de onda de 570nm.

2.6 Cultivo de células

As linhagens neoplásicas DU-145 (carcinoma), PANC-1 (carcinoma epitelióide) e K-562 (Leucemia mielóide crônica) foram mantidas a 37°C contendo 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As linhagens T-47D (carcinoma ductal) e TOLEDO (linfoma) também foram mantidas nas mesmas condições, mas se utilizando de um meio diferente - RPMI 1640. A troca de meio foi realizada sempre que necessário. Para o repique das células aderentes foi utilizado tripsina/EDTA (0,25%).

2.7 Testes de citotoxicidade em células neoplásicas: MTT

O teste de citotoxicidade foi realizado *in vitro* nas células neoplásicas citadas acima, com 4 concentrações: 1µM, 10µM, 50 M e 75µM, além dos controles doxorrubicina, célula e veículo DMSO (0,1% e 0,2%). A citotoxicidade celular foi avaliada pelo método MTT, citado a cima. As células foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Foi adicionado 20 µM da solução de MTT-sal tetrazolium (0,5 mg/ml) e levado novamente para a estufa por mais 3 horas. Após esse período foi adicionado 130 µM de SDS 20% para dissolução do precipitado e as leituras foram feitas em espectrofotômetro de placa, a 570 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos ensaios de citotoxicidade em PBMC's, observou-se a viabilidade celular acima de 75% em todos os compostos nas concentrações de 10 e 75µM, demonstrando assim uma baixa citotoxicidade dos derivados Tiazolidínicos em células não neoplásicas. Os compostos com baixa solubilidade foram substituídos pelos derivados JB-6, JB-8, JB-14 e JB-20, os quais apresentaram alta viabilidade celular e desvio padrão satisfatório, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 01 – Viabilidades celulares e desvios das duas concentrações apresentadas. Os derivados em vermelho foram excluídos do estudo devido a sua baixa solubilidade.

Código do composto	Viabilidade %	
	10 µM	75µM
JB-3	98,17 ± 1,86	99,53 ± 0,80
JB-6	89,07 ± 7,62	90,04 ± 1,57
JB-8	100 ± 0	100 ± 0
JB-14	95,40 ± 2,17	96,43 ± 0,98
JB-20	100 ± 0	81,05 ± 6,73

Os resultados obtidos através dos ensaios citotóxicos em linhagens tumorais, mostram que todos os LPSF JB's não reduziram a viabilidade das células testadas (IC₅₀

> 75 μ M), exceto o LPSF JB-3, que obteve atividade significativa sobre três das linhagens tumorais utilizadas no estudo (PANC-1; DU-145 e TOLEDO). O IC₅₀ de cada linhagem está representado na tabela 02.

Tabela 02- Citotoxicidade dos LPSF/JBs (IC₅₀) em células neoplásicas.

COMPOSTOS	PANC-1	DU-145	T47-D	K562	TOLEDO
LPSF JB-3	35,30 $\pm$ 7,03	39,43 $\pm$ 0,72	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	54,54 $\pm$ 20,35
LPSF JB-6	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0
LPSF JB-8	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0
LPSF JB-14	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0
LPSF JB-20	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0	>75 $\pm$ 0

4. CONCLUSÃO

Os derivados Tiazolidínicos se mostraram não citotóxicos diante de células mononucleares do sangue periférico (PBMNC). O derivado LPSF JB-3 foi o único que apresentou resultados promissores nas linhagens DU-145, PANC-1 e TOLEDO. Assim este derivado, dentre todos os outros testados, apresentou atividade antineoplásica em potencial reduzindo a viabilidade de células de câncer de próstata e pâncreas.

5. REFERÊNCIAS

- ASATI, V.; MAHAPATRA, D.K.; BHARTI, S.K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 87, p. 814-833, 2014.
- CARIOU, B.; CHARBONNEL, B.; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: Time for a reassessment. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 23, n. 5, p. 205–215, 2012.
- Da Rocha Júnior, L. F. et al. (2013). Synthesis of a Novel Thiazolidinedione and Evaluation of Its Modulatory Effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 Production in PBMCs from Rheumatoid Arthritis Patients. *BioMed Research International*. 1-8.
- Ministerio Da Saude, Estimativa 2014 – Incidencia De Cancer No Brasil, (Instituto Nacional De Cancer Jose Alencar Gomes Da Silva (INCA), 2014.
- World Health Organization, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio os órgãos de fomento Capes, CNPQ, FACEPE e INCT-if pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.