ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PCPC14

SCRRENING ANTINEOPLASICO DE NOVOS DERIVADOS GALACTOSÍDEOS.

F. A. dos SANTOS¹, B. L. SILVA³, R. J. ALVES³, M. C. PEREIRA¹, M. G. R. PITTA¹, I. R. PITTA^{1,2} e M. J. B. M. RÊGO¹

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)

³Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, Laboratório de Química Farmacêutica (LQF).

E-mail: flaviana_federal@hotmail.com

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade citotóxica de trinta derivados galactosídeos frente a dez linhagens tumorais e uma linhagem não-tumoral. Frente a linhagem Du-145 apenas 4 derivados de 30 tiveram atividade. Já frente a linhagem de câncer pâncreas Panck-1 os derivados 5 derivados dos 30 exibiram atividade. Nas linhagens em suspensão Molt-4 (leucemia linfoblástica aguda), HL-60 (Leucemia Pro-mielocítica aguda) somente o derivado 1 dos 30 exibiu atividade citotóxica. Já frente a linhagem K-562 (leucemia mielóide crônica) 7 de 30 derivados exibiram atividade. Na linhagem não-tumoral de fibroblasto apenas o derivado 21 apresentou toxicidade relativa com IC50 na concentração de $41,64 \mu\text{M} \pm 15,16$. Os derivados galactosídeos exibiram atividade citotóxica frente a diversas linhagens tumorais e apenas o derivado 21 exibiu atividade citotóxica frente a linhagem não-tumoral MRC-05.

Palavra-chave: Câncer; Galactosídeo; Citotoxicidade;

ABSTRACT: Objective of this work was to evaluate the cytotoxic activity of thirty galactoside derivatives against ten tumor lines and a non-tumoral lineage. In front of the Du-145 lineage only 4 derivatives of 30 had activity. Already in front of Panck-1 pancreatic cancer line the derivatives 5 derived from the 30 exhibited activity. In the Molt-4 suspension (acute lymphoblastic leukemia), HL-60 (acute pro-myelocytic leukemia) lines only the 1 out of the 30 strain exhibited cytotoxic activity. Already in front of the K-562 lineage (chronic myeloid leukemia) 7 of 30 derivatives had activity. In the non-tumor fibroblast line only derivative 21 had a relative IC50 toxicity at the concentration of 41.64 ± 15.16 . Galactoside derivatives exhibited cytotoxic activity against several tumor lines and only derivative 21 exhibited cytotoxic activity against the non-tumor MRC-05 lineage.

Keywords: Cancer; Galactosides; Cytotoxicity;

1. INTRODUÇÃO

O câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 200 doenças que tem em comum o crescimento descontrolado das células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2016; DE ALMEIDA et al., 2005). O câncer é uma doença multifatorial na qual as células adquirem a capacidade de multiplicação e crescem descontroladamente. Os principais fatores externos que levam a essa desordem são os tabagismo, obesidade e hábitos alimentares, o uso de álcool e sedentarismo (WHO, 2013). A busca de novos agentes quimioterápicos é de extrema relevância, principalmente para os pacientes que não respondem aos tratamentos disponíveis, além de buscar pelo desenvolvimento de agentes mais seletivos e eficientes para os diferentes tipos de tumores (BARROS et al., 2012). A resistência às drogas contra o câncer é um dos maiores obstáculos que interferem significativamente na eficácia da quimioterapia frente às neoplasias, levando as células a desenvolverem adaptações aos agentes quimioterápicos disponíveis (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al., 2011). As galectinas formam um grupo de lectinas altamente conservadas que possuem um domínio de ligação a beta-galactosídeos. As galectinas estão envolvidas em funções tumorais essenciais como desenvolvimento, diferenciação, apoptose e metástase. Em muitos casos a expressão diferencial dessas proteínas está ligada a agressividade tumoral (IKEMORI et al., 2014; FLAUBERT; DONALD, 2009). Desta forma inibir essas enzimas seria uma estratégia contra o câncer. Os açúcares são moléculas importantes que podem estar envolvidas em diversos eventos fisiológicos, como o armazenamento de energia, a adesão célula-célula, o crescimento e proliferação celular e as transduções de sinais intercelulares. Essas moléculas também participam da estrutura de uma série de produtos naturais bioativos, e alguns produtos farmacológicos (CHENG et al., 2014). Moléculas conjugadas com açúcares podem apresentar características biológicas e propriedades físico-químicas que podem melhorar a solubilidade em água, redução de toxicidade indesejável e o aprimoramento do reconhecimento celular, explorando transportadores ou lectinas específicas já existentes. Várias pro-drogas galactosídeos apareceram como potenciais candidatos mais seletivos principalmente frente a tumores sólidos em combinação com conjugados de anticorpo- β -galactosidase (OLIVERI et al., 2015). Portanto é de fundamental importância a busca de novas moléculas com atividade anticâncer com menor citotoxicidade e seletividade são de extrema importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas antitumorais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Derivados galactosídeos

Trinta derivados galactosídeos foram sintetizados pelo grupo do Laboratório de Química Farmacêutica (LQF) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) coordenado pelo prof^o Ricardo José Alves. Para os experimentos com as diferentes linhagens, os derivados foram diluídos em DMSO (Sigma) e diluições mais baixas foram feitas diretamente no meio de cultura. A concentração final de DMSO, em todos os testes, incluindo os controles, foi no máximo de 0,2%.

2.2 Cultivo de células

As células das linhagens tumorais de mama MCF-7, câncer de próstata PC-3 e Du-145, melanoma SK-mel-28, A-375 e UACC-62, câncer de pâncreas Mia-Paca-2 e Panck-1 e as linhagens em suspensão Molt-4 (leucemia linfoblástica aguda), HL-60 (Leucemia Pro-mielocítica aguda) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem de fibroblasto MRC-05 foi utilizada para avaliar a citotoxicidade em células normais. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN ou F-12 a depender de sua especificação, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 10 mM de HEPES e

1% U/mL de Penicilina/Estreptomicina. Essa linhagem foi mantida em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

2.3 . Ensaio de citotoxicidade em células neoplásicas e normais: MTT

As células neoplásicas foram plaqueadas na concentração recomendada pelo NCI60 de acordo com o tempo de duplicação de cada linhagem variando de 0,5 a 4 x10⁴/100µl. Os derivados galactosídeos foram adicionadas na concentração de 10 µM e incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C submetidas ao método de MTT. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e o poço não tratado como controle negativo. Em seguida foram adicionados 20 µl da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas na estufa a 37°C. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com SDS em espectrofotômetro de placa a 550 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os derivados galactosídeos foram testados frente diversas linhagens tumorais para avaliar sua atividade antineoplásica (tabela 01). Todos os derivados foram testados na concentração de 10 µM. A partir dos resultados da viabilidade os derivados serão selecionados para avaliação de sua dose respostas nas linhagens em que exibirem atividade. Foram testados frente as linhagens de câncer de próstata PC-3 e Du-145, somente frente a linhagem Du-145 os derivados 07, 14, 16 e 19 diminuíram a viabilidade celular. Frente as linhagens de melanoma SK-mel-28, A-375 e UACC-62 os derivados não apresentaram atividade antineoplásica na dose de 10 µM. Frente as linhagens de câncer de pâncreas Mia-Paca-2 e Panck-1 os derivados 06, 14, 17, 23 e 24 exibiram atividade frente a linhagem de Panck-1. Frente a linhagem de câncer de mama os derivados não exibiram atividade citotóxica. Frente as linhagens em derivadas de tumores hematopoiéticos Molt-4 (leucemia linfoblástica aguda), HL-60 (Leucemia Pro-mielocítica aguda) somente o derivado 06 exibiu atividade citotóxica. Na linhagem K-562 (leucemia mielóide crônica) foram os derivados 04, 05, 06, 07, 14, 21 e 23. Alguns derivados não exibiram atividade em nenhuma das linhagens desta forma os resultados não foram incluídos nesse estudo (dados não apresentados). Cheng et al 2014 demonstrou que os derivados bis-triazolfenilalaninil-galactosídeo apresentaram atividade antitumoral frente a linhagem de mieloma múltiplo (RPMI8226) apresentando IC₅₀ 22,9 µM mas não apresentou citotoxicidade frente as linhagens de K562(leucemia mielóide crônica), Hela (carcinoma cervical epitelial), A549 (adenocarcinoma de pulmão). Suhe colaboradores 2017 isolaram oito Irinoideglicosídeos a partir de um extrato de metanol dos galhos de *Sambucuswilliamsii* var. *coreana* os compostos 2, 3 e 5 apresentaram efeitos citotóxicos apresentando IC₅₀ entre 1,3-8,7 µM contra as linhas neoplásicas SK-MEL-2 (melanoma) e BT-549(mama), além de apresentar efeitos inibitórios na produção de NO (IC₅₀ de 0,9, 1,3 e 1,2 µM, respectivamente).

Tabela 1- Viabilidade celular das linhagens DU-145, Panck-1, HL-60, Molt-4 e K-562 na dose de 10 mM dos derivados galactosídeos.

Galactosídeos	Du-145	Panck-1	HL-60	Molt-4	K562
04	78,64	80,11	96,29	100	69,78
05	65,69	79,87	100	98,75	60,60
06	74,93	61,04	30,47	0	63,27
07	32,31	70,58	100	100	55,55
14	51,25	63,54	91,38	100	58,22
16	46,01	69,41	88,66	98,67	74,05
17	64,01	61,80	100	100	72,79
19	31,62	73,62	87,52	90,94	71,00
21	70,15	78,62	97,72	100	68,95
23	76,28	28,11	95,26	100	60,93
24	70,83	51,68	96,57	100	95,73

Posteriormente testamos os derivados que exibiram atividade citotóxica em células frente a linhagem não-tumoral MRC-05. Avaliamos a atividade frente a células não neoplásicas dos derivados 4,5,6,7,14,16,17,19,21,,23 e 24 e apenas o derivado 21 apresentou IC_{50} na concentração de $41,64\mu M \pm 15,16$ (tabela 2), todos os outros derivados apresentaram $IC_{50} > 100$. Cheng et al 2014 demonstrou que derivados galactosídeos não apresentaram atividade citotóxica frente a linhagem de fibroblasto embrionário de rato MEF.

4. CONCLUSÃO

Assim alguns derivados galactosídeos exibiram atividade citotóxica frente a diversas linhagens tumorais e apenas o derivado 21 exibiu atividade citotóxica frente a linhagem não-tumoral.

5. REFERÊNCIAS

- BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012.
- CHENG, C. Y. et al. Identification of a new bis-amino acid glycoside selectively toxic to multiple myeloma cells. **Carbohydrate Research**, v. 394, p. 39–42, 2014.
- DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- FLAUBERT, M.; DONALD, J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 63, n. 4, p. 571–582, 2009.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, I. et al. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2102–2108, 2011.
- IKEMORI, R. Y. et al. Galectin-3 Up-Regulation in Hypoxic and Nutrient Deprived Microenvironments Promotes Cell Survival. v. 9, n. 11, p. 1–12, 2014.
- OLIVERI, V. et al. **New 8-hydroxyquinoline galactosides. the role of the sugar in the antiproliferative activity of copper(II) ionophores.** [s.l.] Elsevier B.V., 2015. v. 142
- SUH, W. S. et al. Iridoid Glycosides from the Twigs of *Sambucus williamsii* var. *coreana* and Their Biological Activities. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 9, p. 2502–2508, 2017.
- WHO, 2013. Globocan, 2013. **International Agency for Research on Cancer, World Health Organization**, n. December, p. 2012–2014, 2013.

6. AGRADECIMENTOS

Capes, CNPQ, FACEPE e INCT-if.