

## **AValiação DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SUBSTÂNCIAS DAS CLASSES TIOSSEMICARBAZONA E TIAZOL EM LINHAGEM DE CARCINOMA CERVICAL (HELA).**

Bianca Liberato Roberto (IC-Balcão/CNPq), Celso Vataru Nakamura (Co-orientador), Francielle Pelegrin Garcia (Orientador), e-mail: fpggeremias2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

### **Ciências da Saúde – Farmácia**

**Palavras-chave:** câncer cervical, tiazol, antitumoral.

### **Resumo**

O câncer é uma doença não transmissível caracterizada pela multiplicação rápida e anormal de células em determinada parte do corpo. Alguns fatores de risco influenciam no desenvolvimento destas células como tabagismo e exposição à radiação ultravioleta, ou agentes infecciosos como vírus e bactérias. O câncer cervical é o quarto tipo de câncer que mais afeta mulheres, sendo causado principalmente pelo papilomavírus humano (HPV) nas suas formas de alto risco, HPV16 e HPV18. Este tipo de câncer apresenta elevado índice de incidência e óbitos mundialmente, o que indica a necessidade de busca por novos fármacos para seu tratamento. Estudos têm sido feitos em torno de compostos que possuem os grupos isatina e tiazol em sua estrutura, visto que ambos apresentam uma variedade de atividades biológicas já descritas. Tendo isto em vista, este projeto teve por objetivo avaliar a atividade antitumoral de compostos das classes tiossemicarbazona e tiazol e investigar seu mecanismo de ação. Os resultados obtidos demonstraram que apenas algumas das substâncias apresentaram atividade antitumoral e uma delas, PA4, foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, aumentar o potencial de membrana mitocondrial e induzir mudanças morfológicas em células HeLa após 24 horas de tratamento, se mostrando, então, promissora para o desenvolvimento de um novo fármaco.

### **Introdução**

Câncer é um grupo de doenças causadas pelo crescimento anormal de células inicialmente saudáveis. Estas se tornam tumorais devido a algum dano que sofrem em seu DNA e passam a se dividir de forma rápida e descontrolada, formando novas células tumorais ao invés de morrerem. Danos no DNA podem ser causados por fatores hereditários ou fatores externos como o tabagismo, exposição à radiação ultravioleta e poluentes

ambientais. Alguns tipos de câncer podem ser causados por agentes infecciosos como o papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite B (HBV), da hepatite C (HCV) e a bactéria *Helicobacter pylori* (JEMAL et al., 2014). O câncer de colo de útero, ou câncer cervical, é o quarto tipo de câncer mais frequente em mulheres, causado pela infecção persistente das formas de alto risco do HPV (CROSBIE et al., 2013). Uma prevenção para o câncer cervical é a vacina, porém ela não é eficiente contra infecções já estabelecidas e não protege contra todos os tipos de HPV. Apesar dos esforços para diminuir o número de casos desta doença e sua taxa de mortalidade, a taxa de sobrevivência relativa de 5 anos para ela é de 66%, ficando evidente a necessidade da busca por novas formas de tratamento (SOCIETY, 2019). Estudos mostram que o heterociclo isatina apresenta atividade antiproliferativa frente a algumas linhagens de células tumorais (GOMES, 2016). Além disso, estudos recentes também mostram que uma classe de compostos contendo tiazol apresenta uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo a antitumoral (GOMES, 2016). Diante deste cenário, a utilização de substâncias que contenham estes grupos em sua estrutura mostra-se muito promissora para a obtenção de possíveis fármacos antitumorais. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antitumoral de compostos das classes tiossemicarbazona e tiazol e investigar seu possível mecanismo de ação.

## Materiais e métodos

*Avaliação da viabilidade celular* - Células imortalizadas pelo HPV 18 (HeLa) e queratinócitos imortalizados (HaCaT) foram plaqueados ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) e tratados com diferentes substâncias das classes tiossemicarbazona e tiazol nas concentrações de 1 a 100  $\mu\text{M}$  por 48 h a 37°C. Após, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT (2 mg/mL). A concentração inibitória para 50% das células ( $\text{IC}_{50}$ ) foi determinada por meio de regressão não linear.

*Avaliação da morfologia celular* – Células HeLa foram plaqueadas ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) e tratadas com as concentrações  $0,5 \times \text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{50}$  e  $2 \times \text{IC}_{50}$  da substância mais ativa. Imagens dos poços tratados e não tratados foram feitas em microscópio óptico invertido (Olympus CKX41) após 0 h, 24 h e 48 h de incubação.

*Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)* – Células HeLa foram plaqueadas ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) e tratadas com  $0,5 \times \text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{50}$  e  $2 \times \text{IC}_{50}$  da substância PA4 por 24 h. O controle positivo foi  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ). Após as 24h, as células foram marcadas com  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (10  $\mu\text{M}$ ) por 30 min e a fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (VICTOR X3, PerkinElmer).

*Avaliação do potencial de membrana mitocondrial* - Células HeLa foram plaqueadas ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) e tratadas com  $0,5 \times \text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{50}$  e  $2 \times \text{IC}_{50}$  da substância PA4 por 24 h. A substância utilizada como controle positivo foi o

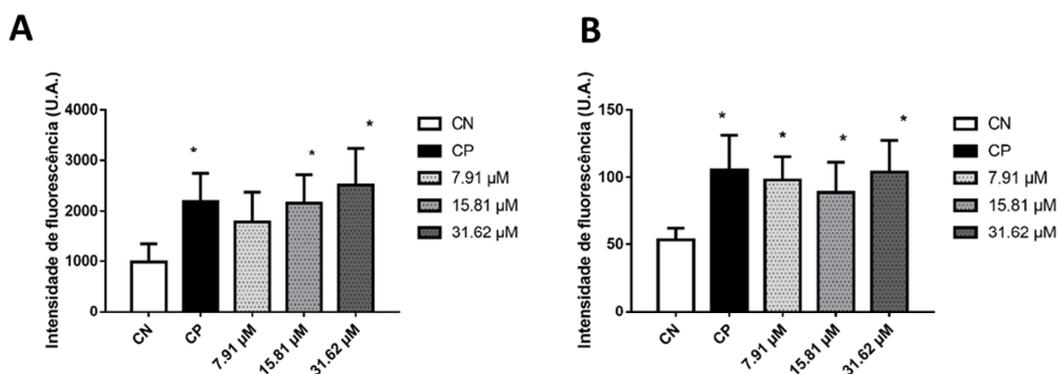
CCCP (200  $\mu\text{M}$ ). Após as 24 h, as células foram marcadas com TMRE (25 nM) por 30 min e a fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro.

## Resultados e Discussão

Das 20 substâncias testadas, apenas 4 apresentaram atividade antitumoral com valores de  $\text{IC}_{50}$  iguais a 15,81  $\mu\text{M}$  (PA4), 6,03  $\mu\text{M}$  (PA5), 83  $\mu\text{M}$  (PA6) e 36,73  $\mu\text{M}$  (3A). A substância PA4, uma tiossemicarbazona cujo  $\text{IC}_{50}$  foi de 30,52  $\mu\text{M}$  em células HaCaT, foi escolhida para a investigação do seu possível mecanismo de ação por apresentar seletividade. Com relação à avaliação da morfologia celular, as imagens mostraram alterações na monocamada celular de forma dose e tempo dependente, de modo que na maior concentração e no maior tempo houve descolamento total das mesmas (imagens não mostradas).

A Figura 1A apresenta os resultados sobre a produção de EROS após 24 h de tratamento. Nota-se o aumento da produção destas espécies de forma dose-dependente quando comparada ao controle negativo (CN). Esse aumento indica que as células sofreram estresse oxidativo, provavelmente induzido pela substância PA4, o que, por sua vez, poderia estar induzindo à morte celular por meio de apoptose. Estudos relatam que um dos mecanismos deste processo de morte “programada” está associado ao estresse oxidativo causado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio.

Além disso, após à avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Figura 1B), é possível notar que PA4 induziu um aumento significativo no potencial em relação às células sem tratamento (CN). Alguns estudos relatam (GERGELY et al., 2002) que este aumento está presente na fase inicial do processo de morte celular por apoptose, e há relatos de mecanismos reguladores deste processo por vias independentes de caspase que apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, hiperpolarização mitocondrial.



**Figura 1** – (A) Produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) por meio do marcador H<sub>2</sub>DCFDA (10  $\mu\text{M}$ ) e (B) Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial por TMRE (25 nM) em células HeLa tratadas (24 h) com diferentes concentrações de PA4 .

## Conclusões

Foi verificado que a substância PA4 possui atividade citotóxica frente à linhagem de células de carcinoma cervical, demonstrado pelo valor de IC<sub>50</sub> obtido. Adicionalmente, ela promoveu alterações morfológicas nas células tratadas, induziu a produção de EROS e ainda promoveu uma hiperpolarização mitocondrial, o que indica que as células podem estar em processo de apoptose. Com esses resultados, esta substância se mostra promissora como uma possível alternativa no tratamento para o câncer cervical, porém mais estudos são necessários para se comprovar seu mecanismo de ação e de indução da morte celular.

## Agradecimentos

Ao CNPq, à Universidade Estadual de Maringá e ao Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos.

## Referências

CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin.Microbiol.Rev.**, v. 16, n. 0893–8512 (Print), p. 1–17, 2013.

GERGELY, P. et al. Persistent Mitochondrial Hyperpolarization, Increased Reactive Oxygen Intermediate Production, and Cytoplasmic Alkalinization Characterize Altered IL-10 Signaling in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 1092–1101, 2002.

GOMES, P. A. T. M. **Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades farmacológicas de inéditas tiazolil-hidrazonas derivadas da ftalimida e da isatina**. 2016. 225f. Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

JEMAL A, VINEIS P, BRAY F, TORRE L, FORMAN D (Eds). **The Cancer Atlas**. 2 Ed. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2014.

SOCIETY, A. C. **Cancer Facts and Figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society; 2019.