SCREENING ANTIPROLIFERATIVO DE COMPOSTOS NATURAIS EM PAINEL DE CÉLULAS TUMORAIS

FRANCO, Yollanda Edwirges Moreira.
Universidade São Francisco- Bragança Paulista- SP

NUNES, Marcela Rosa
Hospital de cancer de Barretos- Barretos-SP

SAITO, Viviane Oliveira Silva
Hospital de cancer de Barretos- Barretos-SP

REIS, Rui Manuel
Hospital de cancer de Barretos- Barretos-SP

Pollyana Hammoud Dias
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São Vicente-SP, Brasil

ROCHA, Claudia Q.
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Departamento de Química- São Luis-MA

LONGATO, Giovanna Barbarini
Universidade São Francisco- Bragança Paulista - SP

Resumo

Introdução: A elevada morbidade provocada pelo câncer justifica a busca de novas drogas que possam atuar mais seletivamente sobre os mecanismos de morte celular. Desde os tempos remotos, as plantas aparecem como potenciais fármacos na quimioterapia e, neste âmbito, os flavonoides apresentam considerável interesse científico e terapêutico, estando envolvidos na prevenção de tumores. **Objetivo:** Inicialmente este estudo visou avaliar a atividade antiproliferativa de 25 flavonoides e, posteriormente, investigar a atividade antitumoral do composto mais eficaz (FLAV5) no processo de migração replicação e mecanismos de morte celular na linhagem mais sensível, denominada U251 (glioma). **Metodologia:** Ensaio antiproliferativo: as linhagens tumorais (5000 céls/poço) foram semeadas em placas de 96 compartimentos e tratadas com os flavonoides (1.6–100 µg/mL). Após 48h, as células foram coradas com MTT (0,25 mg/mL), sendo calculado o valor de GI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular) dos compostos. Migração celular: as células ($1x10^6$ células/poço) foram semeadas em placa de 6 compartimentos. Após atingirem 100% de confluência, foi feita uma ranhura e as células foram então tratadas com FLAV5 (3 µg/mL), sendo as placas fotomicrografadas nos tempos 0 e 48h para observação do fechamento da ranhura. Replicação celular: as células (5000 céls/poço) foram semeadas em placas de 6 compartimentos em solução ágar+RPMI, tratadas com FLAV5 (3

µg/mL) a cada três dias, sendo que ao final de 21 dias as células foram fixadas com formaldeído (0,005%) e coradas com cristal de violeta, sendo contadas as colônias. Mecanismos de morte celular: As células foram tratadas (12 µg/mL-24h) e avaliadas através de citometria de fluxo para ensaios de ciclo celular, apoptose/necroptose e despolarização da membrana mitocondrial. **Resultados:** FLAV5 apresentou valores baixos de GI_{50} para as linhagens tumorais avaliadas, sendo a U251 (glioma) a mais sensível. Este composto foi capaz de inibir a migração celular, sendo que ao final de 48h apenas 27% da largura da ranhura havia sido fechada (vs. 95% do controle). Além disso, FLAV5 reduziu em 82% o número de colônias formadas. Os mecanismos de ação sugerem que o composto é capaz de induzir despolarização da membrana mitocondrial, além de indicar morte por apoptose tardia/necroptose, porém, não foi capaz de induzir uma parada do ciclo celular. **Conclusões:** FLAV5 apresentou promissora atividade antiproliferativa *in vitro*.

Keywords: flavonoides, câncer, atividade antiproliferativa, MTT

1. Introdução

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2016). É uma doença heterogênea multifatorial e uma das maiores causas de mortalidade no mundo inteiro (SIEGEL et al., 2013). No Brasil, a estimativa para o ano de 2015 aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema desta doença no país. Estendendo-se as previsões para o mundo todo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, para o ano de 2030, são esperados 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população (INCA, 2016). O câncer se desenvolve através de processos complexos de múltiplos passos onde ocorrem alterações celulares e que tem em sua origem um processo desordenado de divisão celular. Os danos causados ao DNA e às proteínas podem ser considerados uma das principais causas da carcinogênese (SUTANDYO, 2010). Esses danos podem ser causados por agentes carcinógenos químicos encontrados na fumaça do cigarro e contaminantes da dieta, como a aflotaxina B1; por agentes físicos tais como radiação UV, raios X e raios gama; bem como biológicos, incluindo vírus e bactérias patogênicos, como: *Helicobacter pylori*, o vírus do papiloma humano (HPV) e os vírus das hepatites B e C (HBV/HCV) (Freire e Alves, 2015).

1.2 Câncer e Compostos Naturais

O crescente entendimento da biologia tumoral tem fornecido alvos moleculares para a triagem orientada de quimioterápicos e de agentes quimiopreventivos, geralmente de origem natural ou sintetizados com base em produtos naturais que apresentem maior eficácia terapêutica e menor toxicidade para o tratamento de tumores. Desde os tempos remotos, as plantas aparecem como um excelente recurso para o desenvolvimento de potenciais fármacos, principalmente contra o câncer (GANESAN, 2013). Visto que as fontes naturais são amplamente encontradas na natureza e muitas vezes suas substâncias são de grande potencial terapêutico, existe um amplo campo de estudos com enfoque em compostos naturais na busca de novos produtos anticâncer.

1.3 Flavonoides e câncer

Neste contexto, flavonoides constituem uma ampla classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico. Apresentam estrutura fenólica variável, podendo ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como as flavolignanas; porém frequentemente ocorrem como glicosídeos (BEHLING et al., 2004). Eles são um grupo amplamente distribuído de metabolitos secundários de plantas polifenólicas, normalmente encontrados em gimnospermas, angiospermas. Estudos desenvolvidos nos últimos anos têm provado que os flavonoides são capazes de inibir a proliferação celular, o crescimento tumoral e a carcinogênese. Tem sido amplamente reportado que os flavonoides interferem na iniciação, promoção e progressão do câncer, por modularem diferentes enzimas e receptores responsáveis pela proliferação celular, diferenciação, apoptose, inflamação, angiogênese, metástase e reversão da resistência a múltiplas drogas (RAVISHANKAR et al., 2013).

2. Materiais e Métodos

2.1 Obtenção dos compostos naturais

Inicialmente foram avaliados 25 flavonoides isolados de espécies vegetais, quanto à sua potencial atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas.

2.2 Ensaios de atividade antiproliferativa

2.2.1 Screening antiproliferativo

Para este ensaio, foi utilizado o método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) descrito por MOSMANN (1983) que

consiste em avaliar indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. As linhagens tumorais (5000 céls/poço) foram semeadas em placas de 96 compartimentos e tratadas com os 25 flavonoides (1.6–100µg/mL). Após 48h, as células foram coradas com MTT (0,25mg/mL), sendo calculado, através de regressão não linear pelo programa Origin®, o valor de GI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular) dos compostos. Uma vez determinado o composto com melhor atividade antiproliferative (FLAV5) e a linhagem tumoral mais sensível (U251), os estudos a seguir foram conduzidos:

2.2.2 Ensaio de migração cellular (Wound Healing)

Este ensaio é amplamente utilizado para o estudo das características da migração celular, assim como para a validação de moléculas, que podem interferir no processo migratório. Como descrito por YUE (2010), as células da linhagem U251 ($1x10^6$ céls/poço) foram semeadas em placa de 6 compartimentos. Após atingirem 100% de confluência, foi feita uma ranhura no centro dos poços e as células foram então tratadas com FLAV5 (3 µg/mL), sendo as placas fotomicrografadas nos tempos 0 e 48h para observação do fechamento da ranhura.

2.2.3 Ensaio de Formação de Colônias (FCA)

Para avaliar a capacidade do composto em inibir a replicação das linhagens, foi realizado o ensaio de formação de colônia, conforme descrito por RAFEHI et al. (2011). As células da linhagem U251 (5000 céls/poço) foram semeadas em placas de 6 compartimentos em solução ágar+RPMI, tratadas com FLAV5 (3 µg/mL) a cada três dias, sendo que ao final de 21 dias as células foram fixadas com formaldeído (0,005%) e coradas com cristal de violeta, sendo contadas as colônias em estereomicroscópio.

2.3 Citometria de Fluxo

Os estudos acerca do mecanismo de ação do composto foram realizados no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. Foram coletados 10.000 eventos de cada ensaio.

2.3.1 Quantificação de células em estágios de apoptose

Este teste baseia-se na marcação dupla por anexina V e 7-amino-actinomicina D (7-AAD). As células da linhagem U251 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de $1x10^6$ céls/mL, tratadas com FLAV5 (12 µg/mL) por 24h e, posteriormente, marcadas com anexina V e 7-amino-actinomicina D (7-AAD).

2.3.2 Quantificação de células em fases do ciclo celular

Esse ensaio baseia-se na diferenciação de células nos diversos estágios do ciclo celular pela marcação do DNA com iodeto de propídio (PI), um intercalante de DNA. Essa análise só é permitida após a permeabilização da membrana com o etanol 70% à 4 ºC. As células da linhagem U251 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de $1x10^6$ céls/mL, tratadas com FLAV5 (12 µg/mL) por 24h e, posteriormente, marcadas com PI.

2.3.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Este teste baseia-se na capacidade da mitocôndria em sequestrar o corante fluorescente .Quando esta organela apresenta o potencial transmembrânico inalterado, as células sequestram o corante e emitem fluorescência. Alterações nesse potencial transmembrânico levam ao efluxo do corante de dentro da mitocôncria, gerando eventos com menor fluorescencia quando comparados com células que possuem mitocôndrias intactas (Petit, 1992). As células foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de $1x10^6$ céls/mL, tratadas com FLAV5 (12 µg/mL) por 24h e, posteriormente, marcadas com MitoStatus Red.

2.4 Análise estatística

Os resultados dos testes *in vitro* foram expressos como médias ± desvio padrão das médias. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelos pós testes de Bonferroni, Tukey e teste T. Valores de p menores que 0.05 ($p<0.05$) foram considerados estatisticamente significantes. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e duplicatas técnicas.

3 Resultados

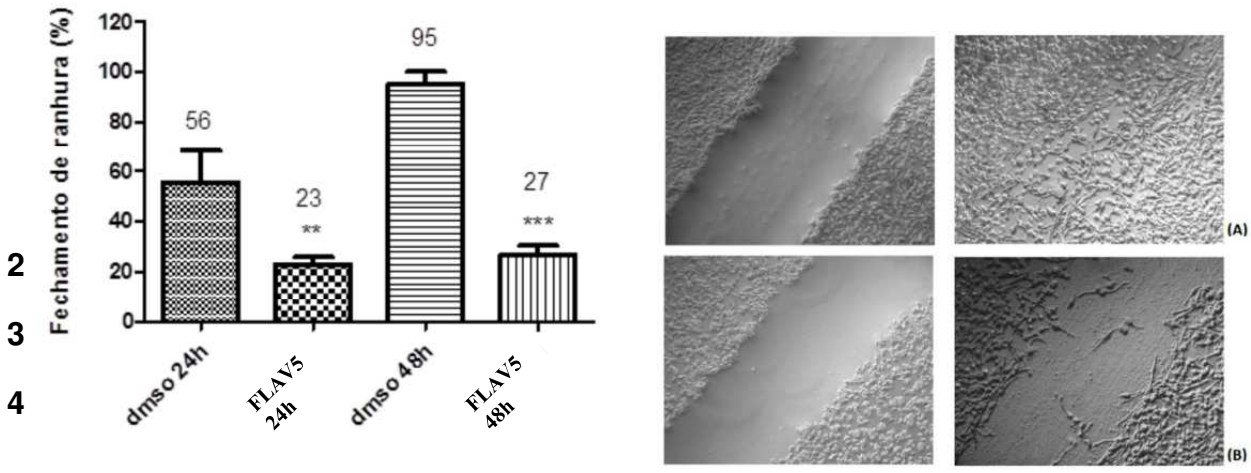
Primeiramente foram avaliados 25 flavonoides frente a um painel de células tumorais, utilizando o método colorimétrico MTT, a TABELA 1 evidencia, os valores de GI50 das linhagens tumorais em que os compostos foram mais promissores, sendo o FLAV5 o mais eficaz e a linhagem U251 escolhida para dar prosseguimento com os ensaios.

GI50	2	M	A	7	4	P	H	HaCaT
Doxo	0,21	-	5,53	3,36	7,53	84,72	64,56	2,90
FLAV1	29,70	27,42	>100	-	29,13	-	66,94	>100
FLAV2	16,45	34,62	63,56	-	20,94	-	19,97	74,36
FLAV3	11,89	22,89	>100	-	11,42	-	14,04	>100
FLAV4	13,41	43,44	>100	-	13,06	-	6,90	79,78

FLAV5	2,60	-	4,26	16,94	2,48	7,43	17,31	2,18

TABELA 1. Atividade antiproliferativa dos flavonoides em cultura de células tumorais humanas$_a$ após 48h de incubação, expressa em GI50$_b$.
a-Método colorimétrico – MTT / b-Os valores de GI50 representam a concentração mínima necessária (µg/mL) para inibição de 50% do crescimento celular. Os valores foram determinados através de análise de regressão não-linear usando o ORIGIN 7.5® (OriginLab Corporation). Os experimentos foram realizados em triplicate experimental. / 2: U251 (glioma); M: MCF-7 (mama); A: NCI/ADR-RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 4: NCI-H460 (pulmão); P: PC-3 (próstata); H: HT-29 (colon); HaCaT (queratinócito – linhagem não tumoral). – Linhagens em que as amostras não foram avaliadas.

Para a avaliação da capacidade do composto em inibir a migração celular, foi empregado o teste *Wound Healing*. Foi observado que, ao final de 24h de tratamento com o composto FLAV5, apenas 23% da largura da ranhura havia sido fechada, ao passo que o tratamento com o controle DMSO induziu um fechamento de 56% da mesma (FIGURAS 1 e 2). Ao final de 48h esta diferença foi ainda mais acentuada, uma vez que o tratamento com o composto FLAV5 reduziu a largura da ranhura em 27%, ao passo que o tratamento com o controle DMSO induziu um fechamento de 95% da mesma (FIGURAS 1 e 2), permitindo inferir que este composto é capaz de inibir a migração de células U251.



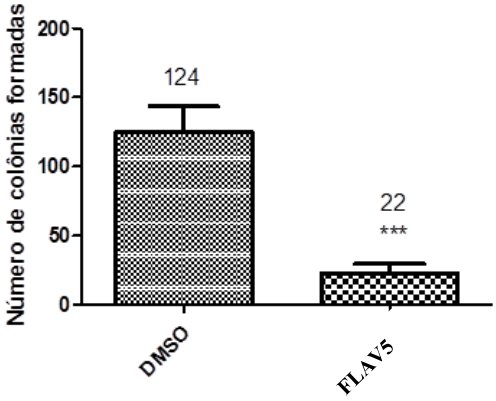
2

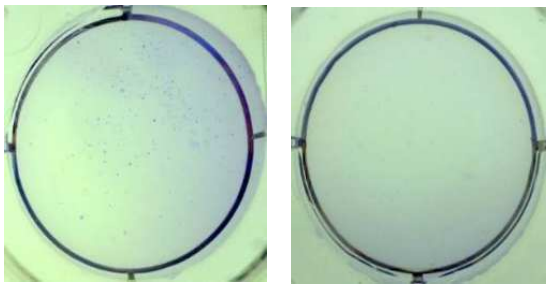
3

4

Figuras 1 e 2. Porcentagem de inibição de migração celular. Ensaio realizado com linhagem U251, relacionando fechamento da ranhura *versus* tempo de tratamento (24 e 48h). O programa ImageJ foi utilizado para o tamanho da ranhura das amostras controle DMSO (A) e composto FLAV5 (B) pelas fotomicrografias adquiridas em microscópio Zeiss (aumento 20x). Análise estatística ANOVA: teste tukey (**p<0,1, ***p<0,001).

Para a avaliação da capacidade do composto em inibir a replicação celular, foi empregado o teste *FCA*. Foi observado que, ao final de 21 dias de tratamento com o composto FLAV5, este reduziu em 82% o número de colônias U251 formadas em comparação ao controle (FIGURA 3). A FIGURA 4 evidencia claramente a diferença do número de colônias entre os poços controle DMSO (A) e o tratado com FLAV5 (B). Por meio deste resultado é possível inferir que FLAV5 apresenta ação sobre os mecanismos de replicação celular em U251.

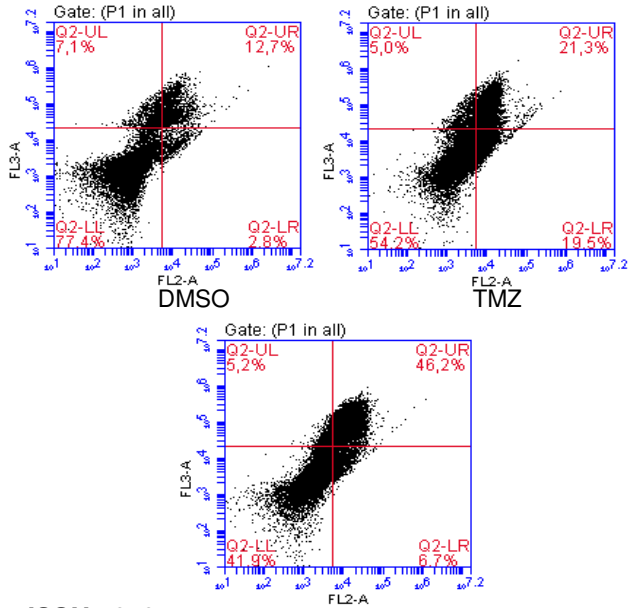


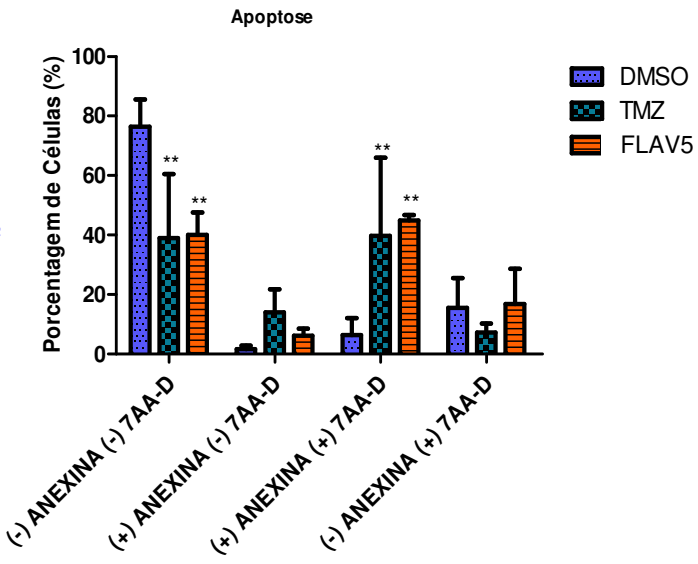


DMSO FLAV5

Figuras 3 e 4. Número de colônias de células U251 (%) formadas. Análise estatística ANOVA: teste t (*** p<0,001).

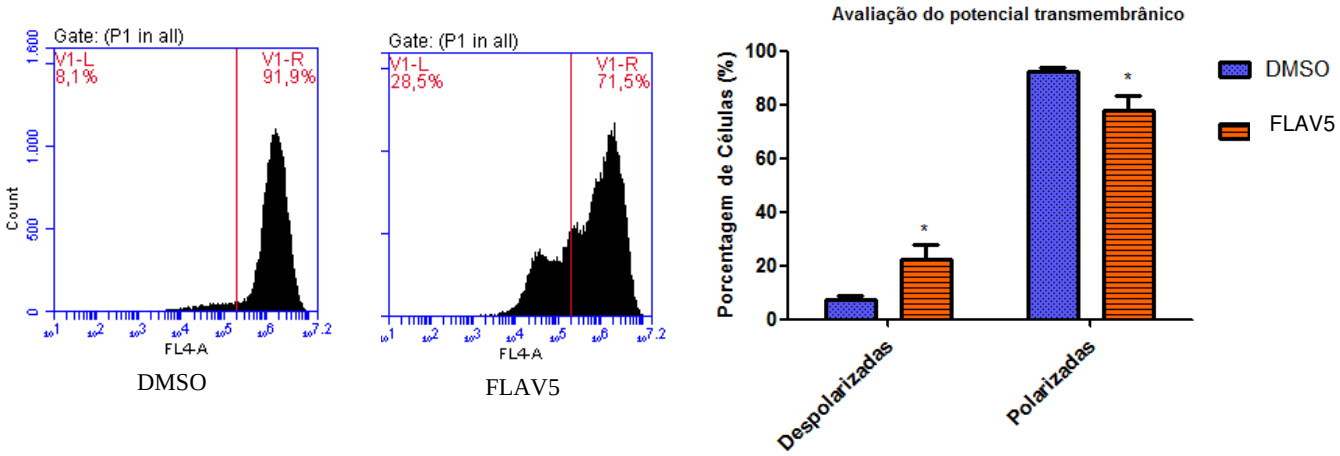
A avaliação dos níveis de apoptose por citometria de fluxo é geralmente utilizada com marcador Anexina, que se associa aos resíduos de fosfatidilserina, externalizados no início do processo apoptótico. A utilização conjunta do marcador nuclear 7AAD, por sua vez, torna possível verificar as alterações nucleares características dos estágios tardios da apoptose, como resultado do aumento da permeabilidade de membrana sinalizando processo de morte celular. Após 24h de tratamento, a concentração de 12 µg/mL de FLAV5 foi capaz de induzir apoptose tardia/necroptose de forma significativa (46,2% das células tratadas versus 12,7% do controle) (FIGURAS 5 e 6)





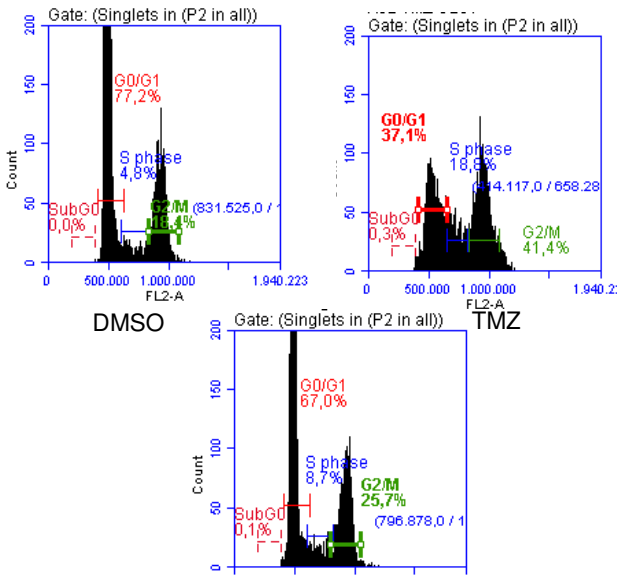
Figuras 5 e 6. Porcentagem de células U251 em diferentes estágios. Viáveis: (-) anexina (-) 7-AAD; apoptose inicial: (+) annexin (-) 7-AAD; apoptose tardia/necroptose: (+) anexina (+) 7-AAD; células não viáveis: (-) anexina (+) 7-AAD. Tratamento: FLAV5 12µg/mL / TMZ 3000 µM /24h. Análise estatística two-way ANOVA: Bonferroni (** p<0,01 *p<0,05).

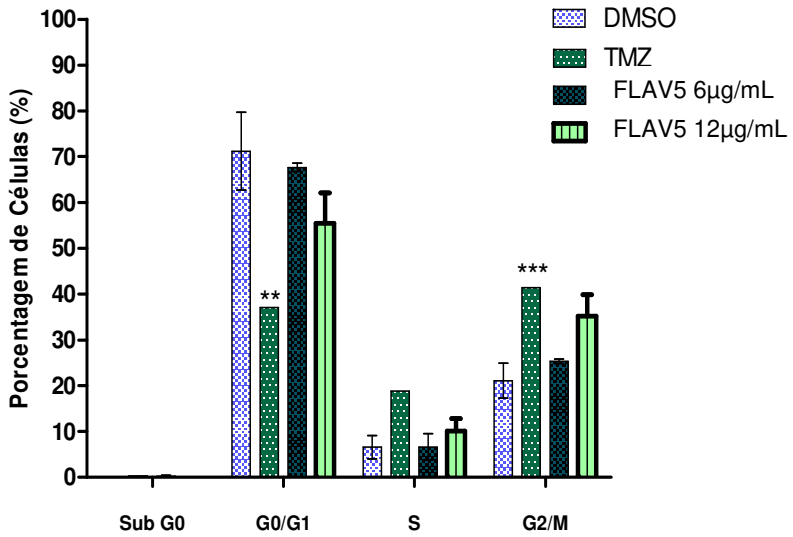
Estudos apontam que o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio mitocondriais pode levar a danos oxidativos no DNA, lipídios e proteínas (Kowaltowski e Vercesi, 2001); além disso a perda do potencial de membrana mitocondrial é uma característica de apoptose, sendo assim a avaliação do potencial transmembrânico é essencial para avaliar os mecanismos de morte celular. O composto FLAV5 também foi capaz de induzir a despolarização da membrana mitocondrial em 28,4% das células versus 8,1% do controle (FIGURAS 7 e 8).



Figuras 7 e 8. Porcentagem de células despolarizadas e polarizadas após o tratamento com FLAV5 (12 µg/mL /24h). Análise estatística two-way ANOVA: Bonferroni (*p<0,05).

A perda do controle do ciclo celular é uma das principais características de células tumorais. Muitos agentes quimioterápicos atuam modulando o ciclo celular, porém o composto FLAV5 nas concentrações utilizadas (6 e 12 µg/mL/24h) não foi capaz de levar a parada do ciclo celular (FIGURAS 9 e 10).





Figuras 9 e 10. Porcentagem de células U251 em diferentes estágios do ciclo celular: SubG0, G0/G1, S e G2/M. Tratamento: FLAV5: 6 e 12 µg/mL e TMZ 1500 µM / 24h. Análise estatística two-way ANOVA: Bonferroni (** p<0,01 *p<0,05).

4 Conclusão

Os resultados obtidos com o composto FLAV5 demonstram sua efetiva atividade antiproliferativa em linhagem tumoral de glioblastoma e estimulam a continuidade dos estudos no processo de investigação do mecanismo de ação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

Behling, E. B.; Sendão, M. C.; Francescato, H. D. C.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. ***Alimentos e Nutrição***, 15:285-292, 2004.

Ganesan, A. The Impact of Natural Products Upon Cancer Chemotherapy. In: **Natural Products and Cancer Drug Discovery**. New York: Humana Press, p. 3-15, 2013.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. www.inca.gov.br (Acesso em 15/01/2017).

Kowatowski, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett. 20;495. (1-2):12-5, 2001.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods,* (65):55-63, 1983.

Petit PX. Flow Cytometric Analysis of Rhodamine 123 Fluorescence during Modulation of the Membrane Potential in Plant Mitochondria. **Plant Physiology**, 98: 279-286, 1992.

Rafehi, H.; Orlowski, C.; Georgiadis, G. T.; Ververis, K.; El-osta, A.; Karagiannis, T. C. Clonogenic assay: adherent cells. ***Journal of Visualized Experiments***, 13:49, 2011.

Ravishankar, D.; Rajora, A. K.; Greco, F.; Osborn, H. M. I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. ***The International Journal of Biochemistry & Cell Biology****,* 45:2821– 2831, 2013.

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A Cancer statistics.***Cancer Journal for Clinician****,* 63: 11–30, 2013.

Sutandyo, N. Nutritional Carcinogenesis**.** ***Nutritional Carcinogenesis***, 42(1):36- 42, 2010.

Yue, P. Y.; Leung, E.P.; Mak, N. K.; Wong, R.N. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. ***Journal of Biomolecular Screening****,* 15(4):427-33, 2010.

AGRADECIMENTOS: FAPESP, CAPES, HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS