

Análogo de Curcumina induz Superexpressão de caspases em linhagem de carcinoma de bexiga

**LUCAS DAMÉ SIMÕES¹; BRUNA S. PACHECO²; NATÁLIA V; SEGATTO²;
FABIANA K. SEIXAS², ANA LAURA FEIJÓ²; TIAGO COLLARES³.**

¹*Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Biotecnologia do Câncer –
lucasdame@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Biotecnologia do Câncer –
naty_segatto@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Biotecnologia do Câncer –
collares.t@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O câncer se tornou uma epidemia em escala mundial. Em âmbito global estimasse em média 17 milhões de novos casos, sendo desses 9.5 milhões diagnosticados em homens (AICR, 2018). Em relação a mortalidade o número de ocorrências chega em 9.6 milhões apenas em 2018 de acordo com a organização mundial de saúde, assim, o câncer se tornou a segunda maior causa de morte perdendo apenas para doenças cardiovasculares (WHO, 2018).

Dentre os vários tipos de neoplasia, o câncer de bexiga é o décimo mais frequente. Sendo esse um dos tipos mais comuns de neoplasia do trato urinário, com aproximadamente 430 mil casos em escala mundial e 9.480 novos casos apenas no Brasil (INCA, 2018). Este tipo de tumor merece destaque pelo fato de representar o maior custo econômico em relação ao seu tratamento para a saúde pública, pelo fato de ter um longo período de tratamento.

Visto isso, embora existam abordagens quimioterápicas comumente utilizadas na clínica para tratar neoplasias de bexiga, elas ainda apresentam inúmeros efeitos adversos. Assim, no âmbito do desenvolvimento de fármacos antitumorais, compostos sintéticos representam uma das principais opções no combate ao câncer.

A curcumina é um composto extraído do açafrão-da-terra, com capacidade de atuar em várias doenças inclusive o câncer (WEIR, 2017). Porém, sua utilização é limitada devido à baixa solubilidade e biodisponibilidade. Nesse sentido, com o intuito de potencializar o uso da curcumina para fins terapêuticos, estudos vêm sendo realizados a fim de sintetizar moléculas tendo como base a sua estrutura química, os denominados análogos de curcumina (CHOI, 2016).

Nesse contexto, devido ao potencial que os compostos sintéticos apresentam e à importância da contínua busca de moléculas com ação antitumoral, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de indução de expressão de caspases pelos compostos análogos de curcumina **1a** e **1d**, além de analisar sua interação com receptores e proteínas relacionados com fatores de crescimento por meio de docagem molecular.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo celular

As células de carcinoma de bexiga (linhagem 5637), obtidas no banco de células do Rio de Janeiro foram cultivadas com meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e mantidas na estufa em atmosfera controlada à 37°C,

95% de umidade e 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

2.2 Análise de expressão gênica

A análise de expressão gênica foi empregada a fim de avaliar as rotas relacionadas com a morte celular e apoptose. Para realizar o teste, 5x10⁵ células da linhagem 5637 foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24 horas, as células foram submetidas a um tratamento com 12,5 µM dos análogos 1a e 1d, depois incubadas por 48 horas. Os poços sem tratamento representam o grupo controle. Posteriormente, o RNA total foi extraído usando o reagente TRIzol™ (Invitrogen™), conforme recomendado pelas instruções do fabricante. A seguir, a concentração e qualidade do RNA foram verificadas no Nanovue Plus Spectrophotometer™ (GE®). Todas as amostras utilizadas para a confecção do cDNA tiveram uma razão de 260/280 entre 1.8 e 2 e uma concentração superior a 100 ng/µL. O cDNA foi produzido com o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems™, UK) usando 110 ng/µL de RNA total. Finalmente as reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) ocorreram no Sistema PCR em tempo real Stratagene® Mx3005P™ (Agilent Technologies, EUA), usando o GoTaq® qPCR Master Mix (Promega™, EUA) e os primers descritos na Tabela 1. A quantificação relativa da expressão gênica foi obtida usando a fórmula 2^(-ΔΔCT) (LIVAK, 2001) e o gene GAPDH foi utilizado como normalizador.

Tabela 1. Primers utilizados no pcr em tempo real e suas respectivas sequências.

| PRIMER | SEQUÊNCIA |
|-------------|----------------------|
| CASP 3 FOR | CAGTGGAGGCCGACTTCTTG |
| CASP 3 REV | TGGCACAAGCGATCGGAT |
| CASP 9 FOR | GTCTCAATGCCACAGTCCAG |
| CASP 9 REV | TGTACATGCAGCAAACCTC |
| GAPDH 3 FOR | GGATTTGGTCGTATTGGG |
| GAPDH 3 REV | TCGCTCCTGGAAGATGG |

2.3 Docking molecular

A técnica de docagem molecular foi empregada para verificar a possível interação dos análogos de curcumina com o sítio ativo do receptor de fator de crescimento epidermal com domínio quinase (EGFRK), além da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK2), sendo que ambas estão relacionadas com a proliferação celular (STAMOS, 2002) (GARAI, 2012). A possível interação entre essa proteína e ligante foi prevista através do software Autodock Vina 1.1.2. (OLEG, 2009). A estrutura cristalizada do EGFRK e da ERK2 foi obtida no repositório Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/pdb/>; código de acesso 1M17, 5Y9Q) e otimizada com o software Chimera 1.5.3, incluindo a remoção de ligantes (PETTERSEN, 2004). Uma *grid box* englobando os resíduos do sítio ativo das proteínas foram implementadas pelo software Autodock Tools. (G. M. Morris). O análogo **1a** foi desenhado no software ChemBioDraw Ultra 13.0 e a estrutura 3D foi obtida com o *software* Avogadro. As interações entre o composto e as proteínas foram visualizadas pelo software Accelrys Dsiccovery Studio 3.5.

2.4 Análise estatística

Os resultados quantitativos da PCR em tempo real foram analisados por one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas,

usando o software GraphPad Prism 7.0. Todos os dados foram expressos como média \pm SEM e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as experiências foram realizadas em triplicatas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da expressão gênica através de qRT-PCR permite investigar as vias envolvidas na morte celular. Para esse fim, foi realizada essa técnica para entender melhor os mecanismos moleculares responsáveis pela indução de apoptose de curcumina **1a** e **1d** em células de carcinoma de bexiga (5637) evidenciada em ensaios anteriores. O tratamento com $12,5 \mu\text{M}$ dos análogos de curcumina **1a** e **1d** demonstrou que o análogo **1a** aumentou significativamente a expressão da caspase-3 e caspase-9. Por outro lado, o análogo **1d** não demonstrou diferença em relação ao controle (Tabela 2).

Tabela 2. Expressão gênica dos genes da Caspase 3 e Caspase 9. Valores referentes à *folding induction* (SEM). Asteriscos indicam diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle. ****: $p < 0,0001$ e ***: $p < 0,001$.

| | Caspase 3 | Caspase 9 |
|-----------|-----------------|----------------|
| Control | 1,00 (0,17) | 1,00 (0,11) |
| 1a | 3,69 (0,63)**** | 3,38 (0,51)*** |
| 1d | 1,31 (0,30) | 1,34 (0,21) |

A fim de hipotetizar qual mecanismo estaria desencadeando a ativação das caspases pelo análogo **1a**, foi realizada docagem molecular do composto com receptores envolvidos na via de sinalização da família ERK, uma vez que a família de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) é conhecida por estar envolvida em importantes processos celulares, como crescimento e diferenciação, mitose, metabolismo, embriogênese, além de seu papel crítico na sobrevivência e apoptose celular (MEBRATU, 2009). Rupturas na via ERK são comuns em cânceres e medicamentos capazes de modular os sinais ao longo dessa reação em cadeia representam possíveis tratamentos contra o câncer (ROBERTS, 2007).

Através da técnica de docagem molecular, foi possível prever que o análogo **1a** obteve uma energia de interação (ΔG) de -7.7 kcal/mol em relação ao EGFRK. Alguns dos resíduos responsáveis pela interação do análogo com o sítio ativo da proteína incluem THR766, ALA719, LEU764, MET742, ASP831, LYS721 e PHE699 (STAMOS, 2002). Quando utilizado a proteína ERK2, foi observado um ΔG de -8.1 kcal/mol, onde pode-se enfatizar os resíduos hidrofóbicos bastante significativos para o reconhecimento molecular ILE31, VAL39, ALE167, ALA32 e LEU156 da proteína (GARAI, 2012). Ambas energias representam valores satisfatórios de interação, sugerindo assim uma possível interação do composto com os receptores da via ERK. Pode-se observar que, em ambos as proteínas testadas, a grande maioria das interações do análogo **1a** com o sítio ativo se deu nos anéis aromáticos da curcumina.

O potencial apoptótico dos análogos da curcumina já foi anteriormente relatado na literatura, onde os compostos mostraram atividade supressora de crescimento por mecanismos apoptóticos contra uma variedade de células cancerígenas, como câncer de pâncreas (WEI, 2012), cabeça e pescoço (LEE, 2014), cólon (OHORI, 2006) e pulmão (DAI, 2015). A indução de apoptose nessas linhagens celulares ocorreu principalmente pela diminuição do nível de Akt e Erk1/2 fosforilados e pela apoptose dependente de caspases (ativação da

caspase-9 e caspase-3), estando de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Já foi proposta também a interconexão da via ERK com a ativação e atividade da caspase (ALLAN, 2003). O bloqueio desta via surge então como uma alternativa promissora para a indução de morte celular em células neoplásicas.

4. CONCLUSÕES

Visto que o análogo de curcumina **1a** demonstrou induzir a expressão de caspases iniciadoras e efetoras em linhagem de carcinoma de bexiga, além de apresentar interação satisfatória *in silico* com receptores da via ERK, pode-se concluir que tal composto sintético possui um potencial uso na indução de morte celular em neoplasias de bexiga.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AICR, American Institute for Cancer Research. 2018. Acesso em 12 set. 2019. Online. Disponível em: <https://www.wcrf.org>.
- WHO, World Health Organization. 2018. Acesso em 12 set. 2019. Online. Disponível em: <https://www.who.int>
- INCA, Instituto Nacional do Câncer. 2018. Online. Acesso em 12 set. 2019. Online. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
- WEIR, Nathan M. et al. Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK. **Cancer biology & therapy**, v. 6, n. 2, p. 178-184, 2007.
- OLEG, T. and O. A. J., "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," **J. Comput. Chem.**, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, 2009.
- MORRIS, G. M., R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, and A. J. Olson, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility," **J Comp Chem**, vol. 30, no. 16, pp. 2785–91, 2009.
- PETTERSEN, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.," **J. Comput. Chem.**, vol. 25, no. 13, pp. 1605–12, 2004.
- OLEG T. and O. A. J., "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," **J. Comput. Chem.**, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, 2009.
- MEBRATU, Yohannes; TESFAIGZI, Yohannes. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?. **Cell cycle**, v. 8, n. 8, p. 1168-1175, 2009.
- ALLAN, Lindsey A. et al. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature cell biology*, v. 5, n. 7, p. 647, 2003.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.