

## EFEITO DE ANÁLOGOS MONOCARBONÍLICOS DE CURCUMINA FRENTE À LINHAGEM DE CARCINOMA DE BEXIGA

ANA LAURA DA SILVA FEIJÓ<sup>1</sup>; LUCAS DAMÉ SIMÕES<sup>1</sup>; NATÁLIA VIEIRA SEGATTO<sup>1</sup>; BRUNA SILVEIRA PACHECO<sup>1</sup>; FABIANA KOMMLING SEIXAS<sup>1</sup>; TIAGO COLLARES<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [sf.analaura@gmail.com](mailto:sf.analaura@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [collares.t@gmail.com](mailto:collares.t@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer, são estimados 430 mil casos em escala mundial de câncer de bexiga para o ano de 2018 (INCA, 2018). Sendo esse o segundo tipo de câncer maligno que mais acomete o trato urinário (SIEGEL, 2015). Além disso, é o quarto câncer mais comum em homens e o oitavo mais comum em mulheres (ZHANG, 2014). As principais formas de tratamento existentes consistem na intervenção cirúrgica, quimioterapia intravesical ou imunoterapia, e essas variam de acordo com o estágio clínico do tumor, podendo ser classificado como não invasivo aos músculos e invasivo aos músculos. (MISRA, 2010). Desta forma, no cenário de busca por novos fármacos antitumorais, os compostos sintéticos representam uma das principais opções no combate ao câncer.

Curcumina é um constituinte extraído dos rizomas secos de *Curcuma longa*, popularmente conhecida como açafrão-da-terra (ELIAS, 2015). Estudos comprovam que este composto possui diversos efeitos biológicos, incluindo ação antifúngica (Martins, 2009), antioxidante (KHALIL, 2012) e neuroprotetora (KUO, 2011). Além disso, a curcumina demonstra ser uma potencial estratégia contra alguns de tipos de câncer (WAGHELA, 2015), incluindo câncer de bexiga (GAO, 2014). A utilização de compostos naturais como modelo para a síntese de novas moléculas é uma estratégia amplamente utilizada. Nesse sentido, análogos de curcumina são uma classe promissora de compostos com potenciais atividades biológicas.

Desta forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica de análogos monocarbonílicos de curcumina frente a uma linhagem de carcinoma de bexiga de grau II (5637).

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Síntese de derivados de curcumina 1a-d

A síntese dos derivados da curcumina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pereira e colaboradores (PEREIRA e et al, 2017) no Laboratório de Lipidômica e Bioorgânica - UFPel. Durante este trabalho foram utilizados derivados de curcumina com diferentes substituintes: (1E,4E)-1,5-(difenilpenta)-1,4-dien-3-on (**1a**); (1E,4E)-1,5-di-*p*-tolilpenta-1,4-dien-3-ona (**1b**); (1E,4E)-1,5-bis(4-clorofenil)penta-1,4-dien-3-ona (**1c**) e (2E,6E)-2,6-bis(2-clorobenzilideno)ciclohexanona (**1d**).

#### 2.3 Cultivo celular

Ao longo do experimento foi utilizada a linhagem celular de carcinoma da bexiga humana (5637), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, IMETRO, Rio de Janeiro, Brasil) e cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) adquirido da Vitrocell Embriolife (Campinas, Brasil). As mesmas foram mantidas em atmosfera e temperatura controladas à 95% de umidade, 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C. As células foram utilizadas em fase logarítmica de crescimento.

### 2.3 Ensaio colorimétrico de MTT

Para determinar a citotoxicidade dos análogos **1a**, **1b**, **1c** e **1d** foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT. Este ensaio avalia a atividade metabólica das células viáveis por meio da redução do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, de coloração amarela em cristais de formazan de cor azul púrpura, sendo assim, possível determinar a porcentagem de células vivas através dos valores de absorbância pela leitura a 492 nm. Para este ensaio, as células foram semeadas a uma densidade de  $2 \times 10^4$  em placas de 96 poços. Após o tempo de 24 h, as células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações dos compostos, sendo **1a** e **1d** testados em concentrações entre 1,56 - 25  $\mu\text{M}$ , e para os análogos **1b** e **1c** as concentrações variaram de 3,125 a 50  $\mu\text{M}$  pelo tempo de 24, 48 e 72 horas.

### 2.4 Ensaio de fluorescência

Para os ensaios Live/Dead e DAPI, as células 5637 foram cultivadas em uma densidade de  $2 \times 10^4$  de células em placas de 96 poços e, após o tempo de 24 h, foram submetidas ao tratamento de 12,5  $\mu\text{M}$  dos análogos de curcumina **1a**, **1c** e **1d** por 48 h. Foi utilizado como grupo controle células sem nenhum tratamento.

As colorações dos ensaios de fluorescência Live/Dead (Invitrogen™, EUA), DAPI (Invitrogen™, EUA) e Texas Red Dead (Invitrogen™, EUA) foram realizados seguindo as instruções do fabricante. Para obtenção das imagens foi utilizada microscopia confocal (Leica Microsystems®) onde foram adquiridas imagens de três campos distintos para cada grupo de tratamento e posteriormente as células foram contadas usando o software Cell ^ F (Olympus®).

### 2.5 Análise estatística

Os resultados do teste de viabilidade celular MTT foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas usando o programa Statistix 8. Os resultados de Live/Dead e DAPI foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, usando o software GraphPad Prism 7.0. O valor de  $\text{IC}_{50}$  (concentração relativa a 50% de inibição no crescimento celular) foi calculado usando o software GraphPad Prism 7.0. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Ensaio colorimétrico de MTT

Com relação ao ensaio MTT obtivemos como resultados que a atividade de citotoxicidade dos análogos da curcumina **1a**, **1b**, **1c**, e **1d** contra 5637 diminuem significativamente o crescimento de células cancerígenas 5637 de uma maneira dependente da dose e do tempo, em geral. Além disso, os compostos **1a**, **1c** e **1d** foram capazes de inibir 50% da viabilidade das células cancerígenas da bexiga com valores de  $\text{IC}_{50}$  na concentração variando de 8,72 a 40,32  $\mu\text{M}$ . O análogo **1d** de curcumina exibiu a maior porcentagem de inibição de crescimento de todos os compostos testados, mostrando  $\text{IC}_{50}$  8,72  $\pm$  1,2  $\mu\text{M}$  para células 5637 após 48 horas de tratamento. O tratamento com veículo DMSO sozinho não promoveu morte celular significativa ou número reduzido de células (dados não mostrados).

### 3.2 Ensaio fluorescência

O ensaio de coloração dupla *Live/Dead* foi utilizado para confirmar a atividade dos compostos **1a**, **1c** e **1d** que demonstraram, através do ensaio de MTT, a capacidade de inibição de mais de 50% do crescimento do carcinoma de células da bexiga. Uma vez que este ensaio permite distinguir, em uma população

de células, entre as viáveis e inviáveis, visto que as vivas serão marcadas de verde pela conversão enzimática da calceína AM, enquanto homodímero de etídio (EthD-1) entrará apenas nas células com membranas danificadas e se ligará a ácidos nucleicos, resultando em uma fluorescência vermelha nas células mortas. Como esperado, o tratamento com os análogos da curcumina **1a** e **1d** diminuíram significativamente o número de células vivas quando comparado ao grupo não tratado. Bem como proporcionaram um aumento na porcentagem de células mortas conforme a Tabela 1.

Tabela 1- número de células vivas e porcentagem de células mortas utilizando o ensaio de Live/Dead do grupo controle (sem tratamento) e os grupos tratados com 12,5 µM dos compostos **1a**, **1c** e **1d** após o tempo 48 h.

	Controle	<b>1a</b>	<b>1c</b>	<b>1d</b>
Número total de células vivas	778 ± 39,5	177 ± 13,75*	572 ± 15,17	269 ± 179,83*
% de células mortas	1,037% ± 0,92.	16,27% ± 12,72	5,17% ± 0,89	17,7% ± 13,47

O ensaio de DAPI, por sua vez foi utilizado para quantificar o número de células totais em um determinado campo de poço através de coloração nuclear. Além disso, as células foram coradas com corante Texas Red-X phalloidin dye (Invitrogen™), que permite visualizar os filamentos de actina no citoesqueleto.

Tabela 2- ensaio de DAPI em 5637. Número de células vivas (± SEM) do grupo controle (sem tratamento) e os grupos tratados com 12,5 µM dos compostos **1a**, **1c** e **1d** após o tempo 48 h.

	Controle	<b>1a</b>	<b>1c</b>	<b>1d</b>
Número total de células vivas	663,6 ± 62,2	57,8 ± 40 *	623,33 ± 50	67,3 ± 5,4 *

Os grupos tratados com os análogos **1a** e **1d** apresentaram número total de células nos poços em cerca de dez vezes menor que o número encontrado no poço controle, demonstrando um alto potencial citotóxico destes compostos para células de carcinoma da bexiga. A atividade citotóxica dos análogos da curcumina sintetizados neste trabalho foi demonstrada em outras linhas celulares de câncer, como próstata (ANAND, 2011) e pulmão (DAI, 2015).

Os dados apresentados sugerem que as modificações químicas presentes nos análogos resultam em uma citotoxicidade, ocorrendo uma diminuição no número total de células (LIANG, 2009). Além disso, os mesmos mostram efeitos sobre o citoesqueleto de actina, como arredondamento celular, que foi evidenciado nas células do carcinoma da bexiga após o tratamento e a coloração com Texas Red, bem como a degradação do citoesqueleto. Evidências mostram que mudanças celulares dramáticas na organização dos filamentos de actina e morfologia celular em diferentes estágios da apoptose (DESOUZA, 2012).

#### 4. CONCLUSÕES

Desta forma, com relação a administração dos compostos **1a,1b**, **1c** e **1d** podemos concluir que os análogos monocarbonílicos de curcumina apresentaram resultados positivos em relação a citotoxicidade sobre as células da linhagem de carcinoma de bexiga 5637. Contudo, destacam-se os compostos **1a** e **1d**, que

obtiveram grande diferença estatística proporcionando uma maior diminuição no número total de células e de células viáveis além de aumentar a porcentagem de células mortas e apoptóticas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- INCA – Estimativa 2019, Incidência de Câncer no Brasil. Acessado em 12 de setembro de 2019. Disponível em <http://www.inca.gov.br/>
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D; JEMAL, A. **Cancer statistics**, 2015. *Ca Cancer J. Clin.*, Hodobeken, v. 63, p. 11–30, 2015.
- L.X. Zhang SN, Yong Q, Wu XL, Synergism inhibition of curcumin combined with cisplatin on T24 bladder carcinoma cells and its related mechanism, *J. Chinese Med. Mater.* 37(11) (2014) 2043–2046.
- MISRA, R.; ACHARYA, S.; & SAHOO, S.K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**. V.15, p.842–850.2010
- C.M.P. de Pereira, B.S. Pacheco, C.C. da Silva, Curcumin and analogues: chemical and biological aspects, **LAP LAMBER**, Saarbrücken, 2017.
- G. Elias, J. Jacob, E. Hareeshbabu, B. Mathew, B. Krishnan, K. Krishnakumar, Curcumin: Transforming the Spice To a Wonder Drug, *Int. J. Pharm. Sci. Res. IJPSR.* 6 (2015) 2671–2680.
- C.V.B. Martins, D.L. Da Silva, A.T.M. Neres, T.F.F. Magalhães, G.A. Watanabe, L. V. Modolo, A.A. Sabino, Â. De Fátima, M.A. De Resende, Curcumin as a promising antifungal of clinical interest, *J. Antimicrob. Chemother.* 63(2009)337.
- O.A.K. Khalil, O.M.M. De Faria Oliveira, J.C.R. Velloso, A.U. De Quadros, L.M. Dalposso, T.K. Karam, R.M. Mainardes, N.M. Khalil, Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid, **Food Chem.** 133 (2012) 1001–1005. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.009.
- C.-P. Kuo, C.-H. Lu, L.-L. Wen, C.-H. Cherng, C.-S. Wong, C.O. Borel, D.-T. Ju, C.-M. Chen, C.-T. Wu, Neuroprotective effect of curcumin in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage., **Anesthesiology**. 115 (2011) 1229–38.
- B.N. Waghela, A. Sharma, S. Dhumale, S.M. Pandey, C. Pathak, Curcumin conjugated with PLGA potentiates sustainability, anti-proliferative activity and apoptosis in human colon carcinoma cells, **PLoS One**. 10 (2015). Y. Gao, Q. Shi, S. Xu, C. Du, L. Liang, K. Wu, K. Wang, X. Wang, L.S. Chang, D. He, P. Guo, Curcumin Promotes KLF5 Proteasome Degradation through Downregulating YAP/TAZ in Bladder Cancer Cells, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014)
- P. Anand, B. Sung, A.B. Kunnumakkara, K.N. Rajasekharan, B.B. Aggarwal, Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone: Role of Michael acceptors and Michael donors, *Biochem. Pharmacol.* 82 (2011) 1901–1909. doi:10.1016/j.bcp.2011.09.001.
- F. Dai, G.Y. Liu, Y. Li, W.J. Yan, Q. Wang, J. Yang, D.L. Lu, D.J. Ding, D. Lin, B. Zhou, Insights into the importance for designing curcumin-inspired anticancer agents by a prooxidant strategy: The case of diarylpentanoids, *Free Radic. Biol. Med.* 85 (2015) 127–137. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.017.
- G. Liang, L. Shao, Y. Wang, C. Zhao, Y. Chu, J. Xiao, Y. Zhao, X. Li, S. Yang, Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents, **Bioorganic Med. Chem.** 17 (2009) 2623–2631. doi:10.1016/j.bmc.2008.10.044.
- M. Desouza, P.W. Gunning, J.R. Stehn, The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis, **Bioarchitecture**. 2 (2012) 75–87. doi:10.4161/bioa.20975.