

## **Avaliação do efeito antiproliferativo de derivados sintéticos de AZT em células de adenocarcinoma de pulmão através de ensaio de MTT**

**JESUS, Laura Costa Beber de; BJÖRKNESJÖ, Stéphanie Caruccio;  
SHULTZE, Eduarda; LEON, Priscila Marques Moura de;  
COLLARES, Tiago Veiras**

*Grupo de Pesquisa em Oncologia celular e Molecular – GPO, Universidade Federal de Pelotas  
- Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal – CDTec/Biotecnologia;  
laura\_cbj@hotmail.com*

### **1 INTRODUÇÃO**

O 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT), também conhecido como zidovudina, é um fármaco conhecido por sua atividade anti-retroviral, inibidor da transcriptase reversa, utilizado no tratamento da imunodeficiência adquirida (AIDS). Foi originalmente desenvolvido como um agente anti-neoplásico, mas, na época, não mostrou a atividade antineoplásica desejada (Hirsh, 1988). Após testes em cultura de células de câncer de mama humano e tumores em ratos este fármaco passou a chamar a atenção por sua atividade inibitória tumoral (Wagner *et al.*, 1997).

O AZT é um nucleosídeo sintético que não possui a hidroxila da posição 3', sendo assim capaz de interromper a elongação da cadeia do DNA, também conhecido por ser um inibidor competitivo da timidina-quinase (Webber *et al.*, 1990). Além disso, AZT induz toxicidade mitocondrial, inibindo a síntese de DNA mitocondrial, mostrando efeitos adversos no uso clínico devido à miopatia causada (Scruggs & Dirks Naylor, 2008).

Compostos calcogênicos, como o selênio (Se), são importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (Braga *et al.*, 1996). O Se participa do sítio ativo da enzima glutationa peroxidase (GSH), que é um dos principais sistemas antioxidantes do organismo; por isso sua atividade antioxidante, promovendo a redução do risco de câncer, envelhecimento e doenças degenerativas (Navarro-Alarcón & López-Martinez, 2000). Assim, a combinação do AZT com o Se poderia proporcionar uma nova classe de drogas farmacêuticas em potencial.

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) avalia a atividade metabólica das células, quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, intensamente corados no interior das células. Para quantificação, estes cristais devem ser dissolvidos com solventes orgânicos, como o dimetilsulfóxido (DMSO), permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria. Este método foi sugerido pela primeira vez por Mossman (1983) e é amplamente utilizado na avaliação do efeito antiproliferativo de drogas antitumorais.

Pacientes com câncer de pulmão possuem uma taxa de sobrevida muito baixa, refletindo o seu alto índice de mortalidade. Os principais motivos desse fato são o diagnóstico tardio da doença e a ineficácia dos tratamentos utilizados. Por essas razões, faz-se necessária a busca de novos tratamentos quimioterápicos (Fischer *et al.*, 2005).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de moléculas de AZT modificadas quimicamente na atividade antiproliferativa em células de

adenocarcinoma de pulmão humano (linhagem celular A549), utilizando ensaio de proliferação celular, MTT.

## **2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)**

### **2.1 AZT e suas modificações estruturais**

As moléculas utilizadas neste estudo foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa do professor Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues da UFSM. As modificações no AZT foram realizadas na tentativa de encontrar um derivado com melhores atividades inibitórias sobre células tumorais. Assim, o grupamento OH da molécula de AZT foi substituído por dois radicais diferentes, um grupo selênio e um metil na formulação, obtendo o AZT-Se-Me; e outro com um grupo selênio e cloro, o AZT-Se-Cl.

### **2.2 Cultivo celular**

A linhagem celular utilizada está armazenada no Banco de Células Tumorais do Grupo de Pesquisa em Oncologia (GPO) dos Laboratórios de Genômica Funcional e Embriologia do CDTec/UFPel. No presente estudo foi utilizada a linhagem de adenocarcinoma de pulmão, chamada A549.

A A549 é uma célula de adenocarcinoma de pulmão humano adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro. Foi isolada em 1972 por D.J. Giard *et al.* através da remoção de um tumor de um homem caucasiano de 58 anos. Estas células foram cultivadas *in vitro*, crescendo rapidamente, em monocamada aderente, com aparência escamosa e bom desenvolvimento.

No cultivo da linhagem celular foi utilizado meio Dulbeco modificado por Eagle (DMEM) (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA). As células são mantidas em estufa (Heal Force®, China) a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. No estágio de sub-confluência (~90%), as células foram tripsinizadas com 0.25% e 0.04% de EDTA (v/v 1:1) (Vitrocell Embriolife) na proporção de 1:3. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

As células foram incubadas em placas de cultura de 96 poços (TTP, Switzerland) a uma densidade de  $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  e mantidas em uma estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Então, o meio será aspirado e substituído por DMEM/SFB condicionado com as diferentes concentrações testadas do AZT, AZTSeMe, AZTSeCl e controle. Após o período de incubação as células foram visualizadas e fotografadas, no aumento de 10x e 40x, em um microscópio invertido Olympus IX71 (Olympus Optical Co., Japan).

### **2.3 Delineamento experimental**

O tratamento da linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão com AZT na sua formulação original foi confrontado com os novos compostos modificados, AZT-Se-Me e AZT-Se-Cl, utilizando como controle a adição de DMSO no cultivo celular. Os compostos foram testados nas concentrações de 12,5µM, 25µM, 50µM, 100µM e 200µM, durante o período de incubação de 24h, 48h e 72h.

### **2.4 MTT**

Após o tempo determinado, foi realizado o teste de proliferação celular por ensaio colorimétrico de MTT (SLADOWSKI, 1993). O meio foi removido e a

cada poço foi adicionado 20mL de MTT (5mg/mL) com 180mL de DMEM+FBS. Após 3h na estufa, os cristais de formazan formados pela degradação do MTT pelas células vivas foram diluídos pela adição de DMSO e a leitura da reação foi feita em 492nm em espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader). A inibição do crescimento celular foi determinada do seguinte modo: inibição do crescimento é igual a absorbância de células controle multiplicado por 100%. Cada resultado foi proveniente da média das absorbâncias de 3 poços diferentes.

### 2.5 Análise estatística

A taxa de inibição de crescimento foi calculada a partir dos dados de absorbância obtidos com a leitura em espectrofotômetro. A análise estatística dos resultados foi realizada por ANOVA e teste Tukey. Considerando diferença significativa  $p \leq 0,05$ .

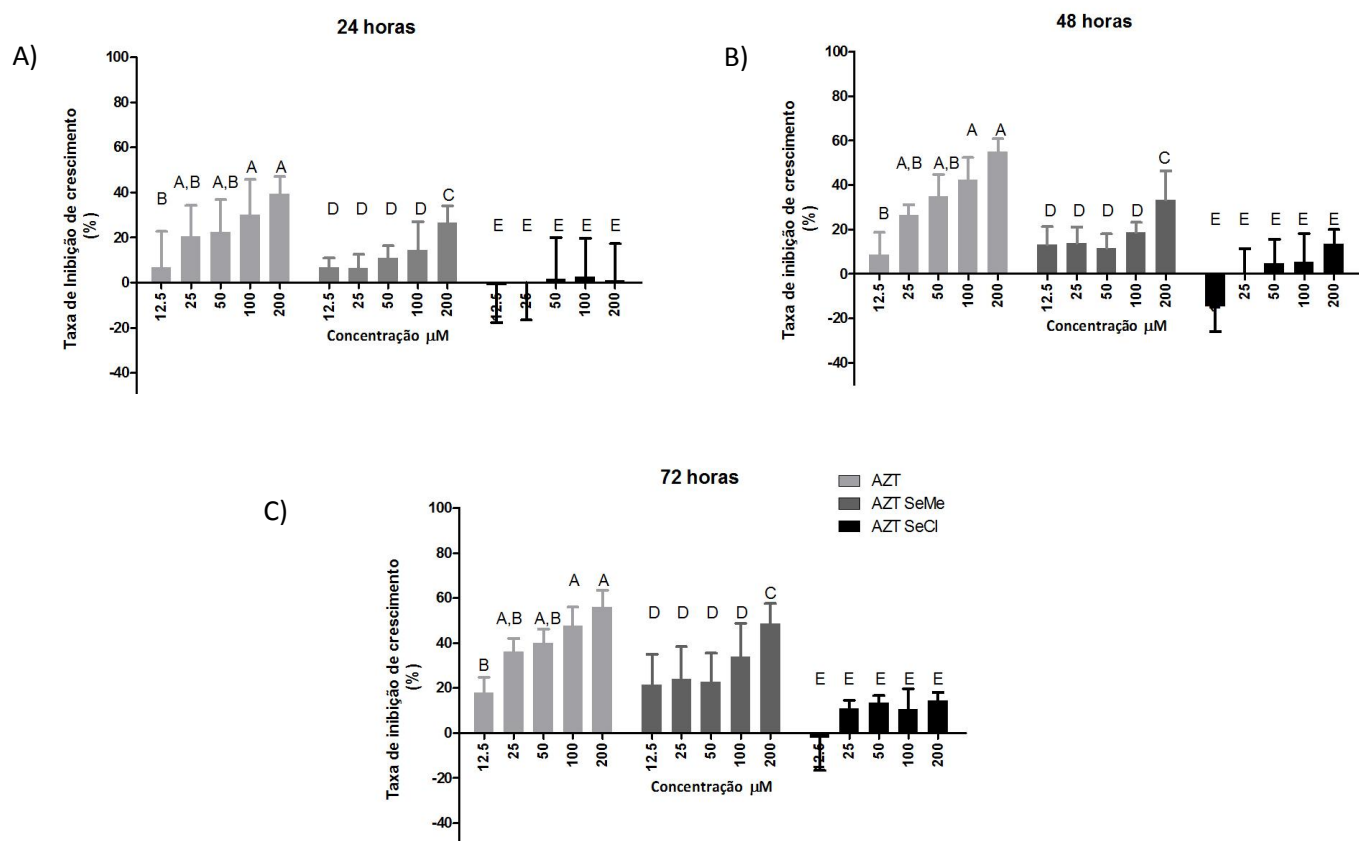
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra a taxa de inibição de crescimento celular observada nos compostos AZT, AZT-Se-Me, AZT-Se-Cl nas diferentes concentrações e tempos de incubação. No composto AZT-Se-Me foi encontrada diferença no efeito inibitório de acordo com a concentração utilizada. No tempo de tratamento de 24h foi observada maior atividade inibitória do composto na concentração de 200 mM em relação as demais concentrações testadas ( $p \leq 0,05$ ). O mesmo efeito inibitório do AZT-Se-Me na concentração de 200 $\mu$ M foi observado em 48 e 72h de tratamento ( $p \leq 0,05$ ). Em relação ao tratamento com o AZT foi observada diferença entre as concentrações de 12,5 $\mu$ M e 100-200 $\mu$ M, de forma que as maiores concentrações do fármaco mostraram uma maior atividade inibitória celular frente ao MTT ( $p \leq 0,05$ ). Esse dado corrobora os resultados obtidos por J.S. Modica-Napolitano *et al.* (2003), que mostraram que o tratamento das células com AZT induziu uma citotoxicidade dose-dependente em células de carcinoma de mama, próstata e cólon.

No estudo de Fischer *et al.* (2005), em que se utilizou o mesmo método MTT, analisando a viabilidade celular em adenocarcinoma de pulmão (A549) submetidos ao tratamento com álcool perílico, a inibição da viabilidade celular, foi de 60,17% ( $p < 0,001$ ), 15,62% ( $p < 0,001$ ) e 11,53% ( $p < 0,05$ ) para as diluições de Álcool Perílico de 0,03%, 0,003% e 0,0003%, respectivamente, indicando o efeito dose-dependente.

## 4 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, concluiu-se que o composto AZT-Se-Me obteve atividade antiproliferativa superior do que o AZT-Se-Cl, com atividade tempo e dose dependente. São necessários mais estudos para avaliar profundamente a atividade destes novos compostos.



**Figura 1.** Taxa de inibição de crescimento celular observada nos compostos AZT, AZT-Se-Me, AZT-Se-Cl nas diferentes concentrações (12,5µM, 25µM, 50µM, 100µM e 200µM). A) Tempo de incubação de 24h; B) Tempo de incubação de 48h; C) tempo de incubação de 72h. Letras indicam diferença estatística entre os tratamentos.

## 5 REFERÊNCIAS

- HIRSH, M.S. Azidothymidine, **J. Infect. Dis.**, v.157, p.427–431, 1988.
- WAGNER, C.R., BALLATO, G., AKANNI, A.O., MCLNTEEE, J., LARSON, R.S., CHANG, S., *et al.* Potent growth inhibitory activity of zidovudine on cultured human breast cancer cells and rat mammary tumors. **Cancer Res.**, v. 57, p.2341–2345, 1997.
- WEBER, G., ICHITAWA, S., NAGAI, M., NATSUMEDA, Y. Azidothymidine inhibition of thymidine kinase and synergistic cytotoxicity with methotrexate and 5-fluorouracil in rat hepatoma and human colon cancer cells. **Cancer Commun**, v.2, p.129–133, 1990.
- SCRUGGS, E.R., DIRKS NAYLOR, A.J. Mechanisms of zidovudine-induced mitochondrial toxicity and myopathy. **Pharmacology**, v.82, n.2, p.83-8, 2008.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MODICA-NAPOLITANO, J.S. *et al.* The selective in vitro cytotoxicity of carcinoma cells by AZT is enhanced by concurrent treatment with delocalized lipophilic cations. **Cancer Letters**, v.198, p.59-68, 2003.
- FISCHER, J.S.G *et al.* Efeito do álcool perílico na expressão gênica de células de adenocarcinoma de pulmão humano. **J Bras Pneumol**, v.31, n.6, p.511-5, 2005.