

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIDERATIVA DE UM NOVO ANÁLOGO SINTÉTICO DE SULFONAMIDA DA CAPSAICINA EM LINHAGENS CELULARES DE ASTROCITOMA DE ALTO GRAU

EVALUATION OF THE ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY OF A NOVEL SYNTHETIC SULFONAMIDE ANALOGUE OF CAPSAICIN IN HIGH-GRADE ASTROCYTOMA CELL LINES

ALVES, Rafael Chiconi de Carvalho¹; SOUZA, João Vitor^{1, 2}; FILHO, Roberto Parisi²;

ORTEGA, Manoela Marques³

¹Graduandos do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco;

²Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo;

³Professora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco

rafael.chiconi@mail.usf.edu.br

joao.v.souza@mail.usf.edu.br

RESUMO

Astrocitomas, tumores malignos do sistema nervoso central mais comuns, são neoplasias cerebrais altamente agressivas, caracterizadas por sua capacidade infiltrativa nos tecidos adjacentes e resistência ao tratamento prevonizado com Temozolamida, resultando em um prognóstico desfavorável. Assim, foi desenvolvido um análogo sintético sulfonil-hidrazônico da capsaicina, denominado RPF101 e foi avaliado a capacidade citotóxica e antiproliferativa do composto em linhagens celulares de astrocitomas de grau III (NG-97) e grau IV (U251) pelo ensaio de proliferação celular utilizado a concentração inibitória de 50% (IC50) por 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O IC50 foi determinado previamente pelo método conhecido como brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) ou MTT. O ensaio de proliferação celular demonstrou um efeito antiproliferativo do composto avaliado nas linhagens celulares de astrocitoma de alto grau, com uma redução significativa na proliferação celular observada após 24 horas de exposição (valores de $p \leq 0,05$). Observações morfológicas indicaram apoptose nas células expostas a concentrações IC50. O ensaio de proliferação celular também demonstrou uma redução significativa na proliferação com possível comprometimento do ciclo celular após 48 horas de tratamento. Em nosso conhecimento, este estudo foi o primeiro que testou o composto JB29 em linhagens celulares de astrocitomas de alto grau e os resultados sugeriram que JB29 parece ser um potencial composto terapêutico; embora estudos adicionais poderão comprovar o papel de JB29.

Palavras-chave: Astrocitomas de alto grau; análogo sintético sulfonil-hidrazônico da capsaicina; linhagens celulares de astrocitomas de alto grau; efeito antiproliferativo.

ABSTRACT

Astrocytomas, the most common malignant central nervous system tumors, are highly aggressive brain neoplasms characterized by their infiltrative capacity into adjacent tissues and resistance to standard treatment with Temozolomide, resulting in an unfavorable prognosis. Therefore, a synthetic sulfonil-hydrazone analog of capsaicin, named RPF101, was developed

and its cytotoxic and antiproliferative properties were assessed in grade III (NG-97) and grade IV (U251) astrocytoma cell lines using the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) in a cell proliferation assay over 24, 48, 72, 96, and 120 hours. The IC₅₀ was determined previously using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide or MTT method. The cell proliferation assay demonstrated an antiproliferative effect of the tested compound in high-grade astrocytoma cell lines, with a significant reduction in cell proliferation observed after 24 hours of exposure (p-values ≤ 0.05). Morphological observations indicated apoptosis in cells exposed to IC₅₀ concentrations. The cell proliferation assay also demonstrated a significant reduction in proliferation and a possible cell cycle control after 48 hours of treatment. This study, the first to test the JB29 compound in these cell lines, suggests its potential as a therapy for high-grade astrocytomas, highlighting the need for further investigations and potential therapeutic developments.

Keywords: High-grade astrocytomas; synthetic sulfonil-hydrazone analog of capsaicin; high-grade astrocytoma cell lines; antiproliferative effect.

INTRODUÇÃO

Astrocitomas são um tipo de tumor primário do sistema nervoso central (SNC), que se originam das células gliais ou de células precursoras e podem se desenvolver em diferentes subtipos, incluindo astrocitomas, oligodendroastrocitomas, ependimomas e oligoastrocitomas (XU et al., 2020). Os astrocitomas são os tumores mais frequentes, constituindo 30% dos casos e incidência após os 50 anos de idade. Estima-se que ocorram, anualmente, no Brasil, cerca de 11 mil casos de tumores primários do SNC, causando mais de nove mil mortes. Aproximadamente 80% dos tumores malignos do SNC são astrocitomas. A incidência de astrocitomas é muito variável ao redor do mundo, sendo a média mundial de 3,4 casos por 100 mil habitantes por ano, com predominância no sexo masculino (RASMUSSEN et al., 2017; VALADARES et al., 2021).

A quarta edição de classificação dos tumores do SNC considerava os astrocitomas em astrocitoma pilocítico (grau 1), astrocitoma difuso (grau 2), astrocitoma anaplásico (grau 3) e glioblastoma (GBM) (grau 4), sendo este último dividido em GBM primário e secundário, dependendo da ausência ou presença de mutação nos genes Isocitrato Desidrogenase 1 e 2 (*IDH1* e *IDH2*) (LOUIS et al., 2016). A quinta edição apresenta como alteração que os tumores antes conhecidos como astrocitoma anaplásico ou GBM secundário, agora estão sob um único diagnóstico, ou seja, astrocitoma difuso *IDH*-mutante, com base na presença de mutação nos genes *IDH* e na ausência da codeleção do cromossomo 1p19q, o qual se presente modifica o diagnóstico para oligodendroglioma. Além disso, o astrocitoma difuso *IDH*-mutante pode ser classificado em graus 2, 3 ou 4 a depender das características histológicas e moleculares (LOUIS et al., 2021). Ainda, o GBM, o mais frequente e maligno dos astrocitomas, apresentam uma incidência média de 5-7 casos por 100.000 indivíduos e, apesar de inúmeros avanços no diagnóstico e tratamento desses tumores, seu prognóstico permanece ainda bastante limitado com média de sobrevivência entre 10 e 15 meses após o diagnóstico, sendo que apenas 0,05% a 4,7% dos pacientes sobrevivem até 5 anos após o diagnóstico (PHILIPS et al., 2018; DIAO et al., 2019).

O tratamento preconizado para astrocitomas graus 3 e 4 é a remoção cirúrgica seguida de radiação e Temozolomida (TMZ); entretanto, radiação e TMZ também podem induzir autofagia

protetora para evitar a morte excessiva das células tumorais com consequente resistência ao tratamento (YIN; LI, 2018).

Para o presente estudo foi desenvolvido um análogo sintético sulfonil-hidrazônico da capsaicina, componente ativo de pimentas conhecidas como *chili*, que são plantas que pertencem ao gênero *Capsicum*, denominado RPF101. O composto foi desenvolvido por meio da sulfonilação da hidrazina em uma solução alcalina e na presença de compostos clorossulfônicos aromáticos, resultando na formação do intermediário sulfonil-hidrazida. Posteriormente, o intermediário foi submetido a uma reação de formação de iminas, através da adição nucleofílica de aminas a aldeídos ou cetonas aromáticos, resultando na obtenção da sulfonil-hidrazona (conforme relatado por FERNANDES, 2015 e GATTI, 2015).

Este composto demonstrou uma variedade de propriedades farmacológicas, incluindo efeitos sedativos, hipnóticos, hipotensivos, antimitóticos, analgésicos, bem como diversas atividades biológicas, como ação bactericida, fungicida e inseticida (conforme observado por OLIVEIRA, 2005). Portanto, o objetivo do presente estudo consistiu em investigar a atividade antiproliferativa dessa nova molécula em linhagens celulares de astrocitomas de alto grau, a fim de expandir a compreensão sobre seu potencial terapêutico.

METODOLOGIA

Linhagem celular e reagentes

As linhagens celulares de astrocitoma anaplásico de grau III (NG97) e astrocitoma grau 4 (U251), foram gentilmente doadas pela Dra. Adriana da Silva Santos Duarte, Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As células NG97 foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI)-1640 (Manassas, Virgínia, Estados Unidos da América [EUA]) e as células U251, em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com alto teor de glicose (Manassas, Virgínia, EUA), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil) e 1% de penicilina/estreptomicina (Vitrocell). As células foram mantidas em incubadora de células com 5% CO₂ a 37°C por pelo menos 3 dias antes dos experimentos propostos.

A sulfanil-hidrozana foi dissolvida em 0,8% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).

O composto sulfanil-hidrazona

A sulfonil-hidrazona foi sintetizada pelo Prof. Dr. Roberto Parise Filho, da Universidade de São Paulo (USP), Laboratório de Planejamento e Síntese de Substâncias Bioativas (LAPESB). Os métodos sintéticos, de caracterização e determinação de pureza da molécula foi descrita em estudos anteriores (FERNANDES et al., 2018 e FERNANDES, 2017). Resumidamente, o composto foi obtido por meio de duas etapas sintéticas, a partir do composto RPF101, a sulfonilação da hidrazina em meio básico, na presença de clorossulfônicos aromáticos, obtendo-se assim o intermediário sulfonil-hidrazida. Na segunda etapa o intermediário foi submetido à reação de formação de iminas por adição nucleofílica de aminas a aldeídos ou cetonas aromáticos. A reação ocorreu em solvente polar prótico e aquecimento, obtendo-se como composto final sulfonil-hidrazona (FERNANDES, 2015; GATTI, 2015). O composto foi denominado de JB29 (Figura 1).

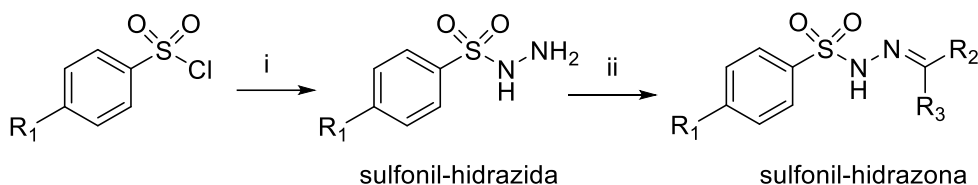


Figura 2: Etapas sintéticas para obtenção da sulfonil-hidrazona JB29. Na primeira reação observa-se a sulfonilação da hidrazina resultando na sulfonil-hidrazida, a qual, na segunda etapa, foi submetida à reação de formação de iminas por adição nucleofílica de amina a aldeídos ou cetonas aromáticos, obtendo por fim, a sulfonil-hidrazona. Fonte: FERNANDES, 2015; GATTI, 2015.

Ensaio de proliferação celular

A viabilidade das células foi medida em estudo prévio utilizando o *4,5-dimethylthiazol-2-yl*-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), após exposição das linhagens celulares à diferentes concentrações (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 μM) de JB29 por 24, 48, e 72 h. Após o tratamento, as células foram incubadas com 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MTT (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por 4 horas a 37°C. Os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 μL de DMSO (Sigma) e a absorbância foi medida a 540 nm em um leitor de espectrofotômetro (Epoch BioTek, Winooski, Vermont, EUA). A viabilidade celular foi expressa como porcentagem de células normais. A partir deste ensaio, a citotoxicidade do composto em teste foi quantificada em valores de concentração inibitória média (IC₅₀), ou seja, a concentração necessária para reduzir 50% da viabilidade celular (SOUZA et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2017).

Para o ensaio de proliferação, ambas as linhagens celulares, NG-97 e U251 (0,5x10⁶ células/poço), foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 horas em triplicatas. Em seguida, as células foram expostas ao IC₅₀ do composto JB29 encontrada para cada linhagem. As células foram submetidas à tripsina e contadas em intervalos de tempo fixos (24, 48, 72 e 96 horas) usando o ensaio de exclusão de corante azul de Tripan. Células não tratadas foram utilizadas como controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto JB29 apresentou evidente redução na viabilidade celular para ambas as linhagens celulares estudadas principalmente após 48h e 72h de exposição (Figuras 2A e 3A). Para as células NG-97 observou-se redução da viabilidade principalmente a partir da concentração de 600 μM após 48h e 72h de exposição, sendo o IC₅₀ de 800 μM (Figura 2A). As células U251 apresentaram evidente redução na viabilidade a partir da dose mínima testada (50 μM) após 72h de tratamento, sendo esta a concentração IC₅₀ (Figura 3A). Alterações morfológicas sugestivas de apoptose, como a diminuição do volume celular e a perda da característica de aderência e do aspecto fusiforme, tornando-se arredondadas, foram observadas nas células expostas à JB29 nas concentrações IC₅₀ acima (Figuras 2B e 3B).

O ensaio de proliferação celular demonstrou um efeito antiproliferativo do composto JB29 nas linhagens celulares de astrocitoma de alto grau, com uma redução significativa na proliferação celular observada após 48 horas de exposição (valores de $p \leq 0,05$) (Figuras 2C e 3C).

Em nosso conhecimento este composto está sendo testado pela primeira vez em linhagens de astrocitomas de alto grau.

Estudos anteriores avaliaram compostos derivados de (E)-N-2(5H)-furanil sulfona hidrazona em linhagens de células de câncer humano, como MCF-7, onde demonstraram alta atividade citotóxica. O mecanismo citotóxico envolveu a parada da fase G2/M do ciclo celular, possivelmente devido a danos no DNA (Yang, Kai et al, 2021).

Além disso, uma série de sulfonil-hidrazonas foi sintetizada e avaliada quanto à atividade citotóxica em linhagens de células de câncer de próstata (PC3) e mama (MCF-7), bem como em linhagens de células de fibroblastos de camundongo L929. Um dos compostos, N'-[(2-cloro-3-metoxifenil)metilideno]-4-metilbenzenossulfonohidrazida (3k), destacou-se como um potente agente anticancerígeno com alta seletividade para células cancerosas. Investigações adicionais confirmaram que o composto 3k induziu alterações morfológicas nas células e promoveu a apoptose, regulando negativamente a proteína Bcl-2 e positivamente a expressão de Bax. Além disso, o composto 3k demonstrou forte inibição da COX-2, com menor impacto na COX-1 (Şenkardeş, Sevil, 2020).

Haleto de hidrazonoil também foram estudados por suas atividades biológicas, exibindo alta citotoxicidade em várias linhagens celulares de câncer humano e atividade citotóxica em linhagens celulares normais. Esses compostos induziram apoptose por meio da regulação positiva da caspase-3 e do mecanismo *P53* mediado por *BAX*, embora tenham promovido a expressão da proteína antiapoptótica *BCL2* (Mohamed, Magda F et al, 2019).

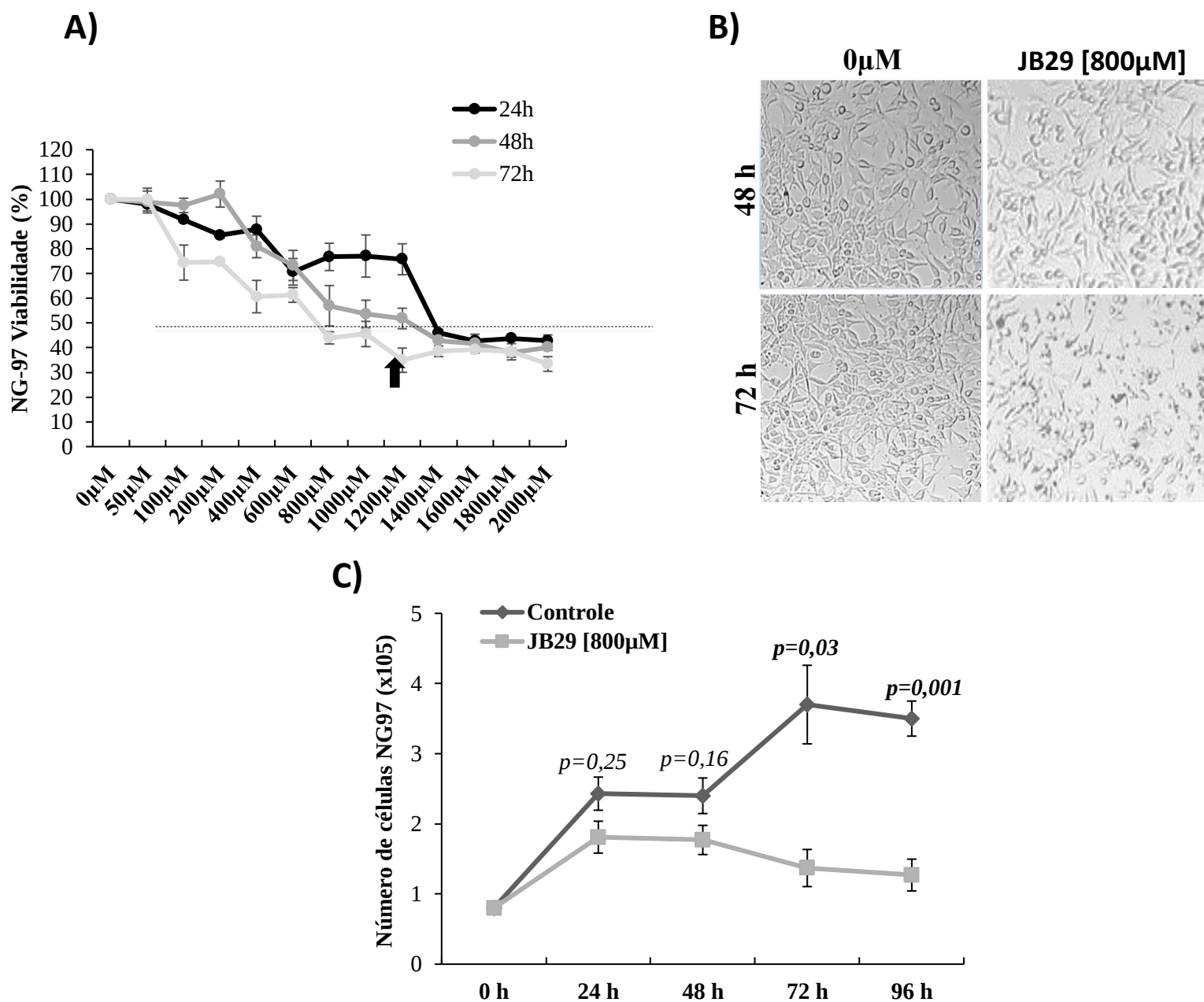


Figura 2: **A)** NG-97 expostas com 50μM, 100μM, 200μM, 400μM, 600μM e 800μM, 1000μM, 1200μM, 1400μM, 1600μM 1800μM e 2000μM do composto JB29 por 24, 48 e 72 horas. **B)** Morfologia das células NG-97 expostas a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) de 800μM por 72 horas. **C)** Inibição da proliferação celular nas células NG-97 expostas a 800 μM do composto JB29 por um período de 96h. Observa-se inibição significativa a partir de 72h de exposição. Os valores foram apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes (T-Teste).

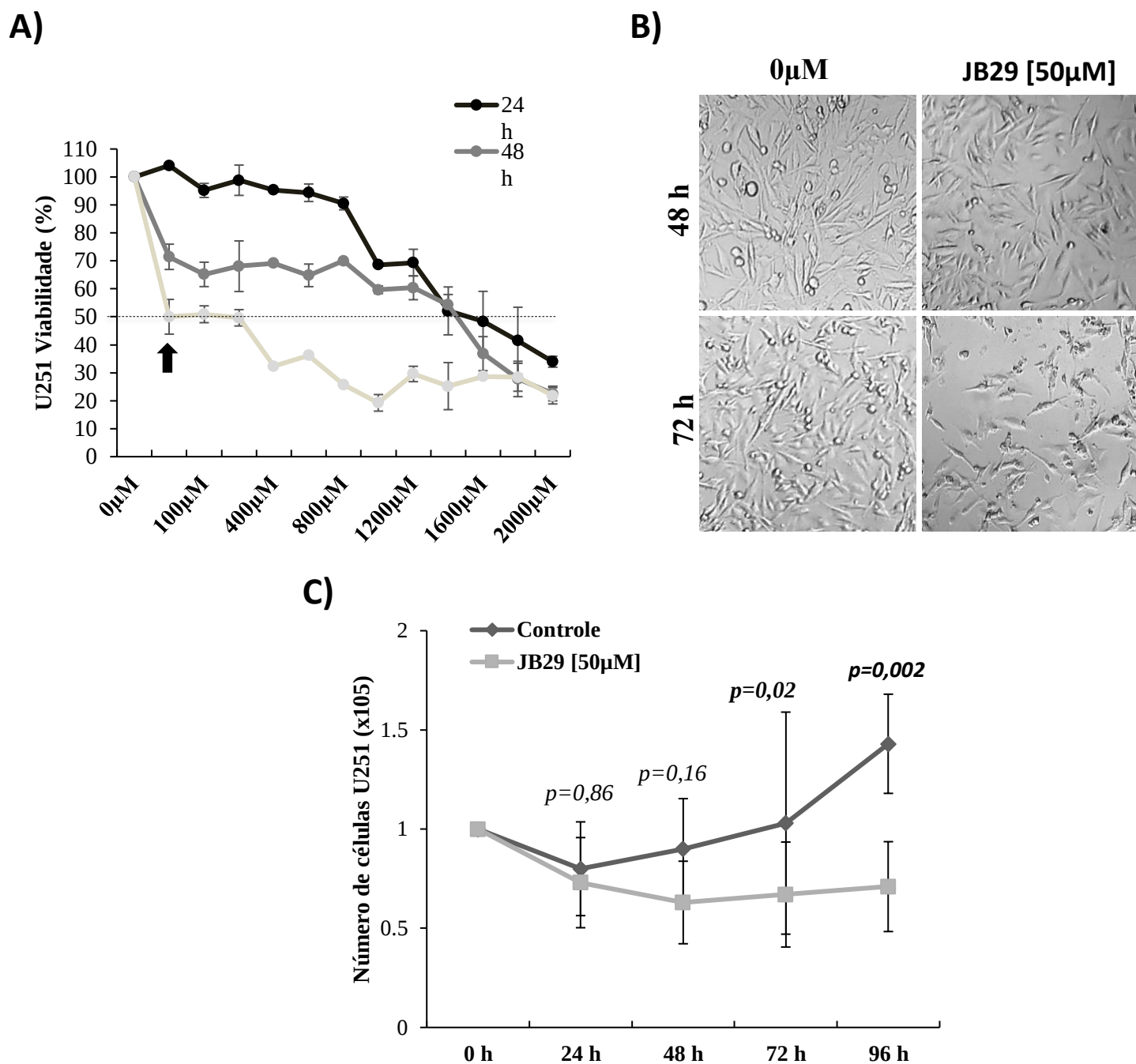


Figura 3. **A)** U251 expostas com 50μM, 100μM, 200μM, 400μM, 600μM e 800μM, 1000μM, 1200μM, 1400μM, 1600μM 1800μM e 2000μM do composto JB29 por 24, 48 e 72 horas. **B)** Morfologia das células U251 expostas a concentração inibitória de 50% (IC50) de 50μM por 72 horas. **C)** Inibição da proliferação celular nas células U251 expostas a 800 μM do composto JB29 por um período de 96h. Observa-se inibição significativa a partir de 72h de exposição. Os valores foram apresentadas como média e desvio padrão de três experimentos independentes (T-Teste).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, observamos que o composto JB29 demonstrou um impacto significativo na viabilidade e proliferação celular nas linhagens de astrocitoma de alto grau 3 (NG-97) e 4 (U251). Observou-se uma clara redução na viabilidade celular, especialmente após 48 e 72 horas de exposição, com concentrações IC50 variando de 800µM para as células NG-97 e 50 µM para as células U251. Além disso, as observações morfológicas sugerem que o composto induz apoptose nessas células.

Os resultados do ensaio de proliferação celular reforçam a eficácia do composto JB29, com uma redução significativa na proliferação celular após 48 horas de tratamento. Isso indica que o composto pode ter potencial para ser uma terapia promissora no tratamento de astrocitomas de alto grau.

É importante salientar que este estudo representa o primeiro teste do composto JB29 em linhagens de astrocitoma de alto grau, o que ressalta a relevância desses achados iniciais. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender completamente os mecanismos de ação envolvidos e para avaliar a segurança e eficácia do composto em modelos animais e, eventualmente, em ensaios clínicos. Esses resultados fornecem uma base sólida para investigações futuras e o desenvolvimento potencial de uma nova abordagem terapêutica para pacientes com astrocitomas de alto grau.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RASMUSSEN, B. K. et al. Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I–IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 135, n. 3, p. 571–579, 1 dez. 2017.

VALADARES, A. D. et al. Perfil Anatomopatológico e Imuno-histoquímico de Gliomas de Pacientes da Região de Maringá-PR. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 3, 21 jul. 2021.

LOUIS, D. N. et al. **The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary**. *Acta Neuropathologica* Springer Verlag, , 1 jun. 2016.

LOUIS, D. N. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 1 ago. 2021.

PHILIPS, A. et al. Brain tumours: Rise in glioblastoma multiforme incidence in England 1995–2015 Suggests an Adverse Environmental or Lifestyle Factor. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2018, 2018.

DIAO, W. et al. Behaviors of Glioblastoma Cells in in Vitro Microenvironments. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

YIN, C.; LI, P. Growth suppression of glioma cells using HDAC6 inhibitor, tubacin. **Open Medicine (Poland)**, v. 13, n. 1, p. 221–226, 1 jan. 2018.

FERNANDES, Thais Batista. Planejamento, síntese e avaliação do potencial antitumoral de compostos arilsulfonil-hidrazônicos. 2015. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos)

- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GATTI, Fernando de Moura. Síntese e avaliação biológica de sulfonil-hidrazonas análogos do nitrofuril como candidatos a antichagásicos. 2015. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Fernandes TB, Azevedo RA, Yang R, Teixeira SF, Trossini GHG, Barbuto JAM, Parise-Filho R. Arylsulfonylhydrazones induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Letters in Drug Design & Discovery* 2018;15:1288-1298, 2018.

Oliveira KN. Síntese, caracterização e avaliação biológica de sulfonamidas e sulfonilhidrazonas. (Dissertação de Mestrado) - Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

Fernandes TB, Cunha, MR, Sakata RP, Candido TM, Bab AR, Tavares MT, Barbosa EG, Almeida WP, Parise-Filho R. Synthesis, molecular modeling, and evaluation of novel sulfonylhydrazones as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archiv. Der. Pharmazie*. 2017;350:1700163-16.

Sousa JF, Cristofaro LF, Serafim RB, Netto RP, Souza FD, Soares CP, Valente V. A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA. *Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 2015;36(2):213-218.

Guimarães DG, Rolim LA, Gonsalves AA, Araújo CRM. Investigação do potencial biológico de hidrazonas obtidas sinteticamente na última década (2006-2016): uma revisão sistemática. *Rev. Virtual Quim.* 2017;9(6):2551-2592.

Yang, Kai et al. "Synthesis of N-2(5H)-furanonyl sulfonyl hydrazone derivatives and their biological evaluation in vitro and in vivo activity against MCF-7 breast cancer cells." *Bioorganic chemistry* vol. 107 (2021)

Şenkardes, Sevil et al. "Synthesis, molecular docking and evaluation of novel sulfonyl hydrazones as anticancer agents and COX-2 inhibitors." *Molecular diversity* vol. 24,3 (2020).

Mohamed, Magda F et al. "Biological Activity, Apoptotic Induction and Cell Cycle Arrest of New Hydrazonoyl Halides Derivatives." *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* vol. 19,9 (2019).