

O composto pterocarpanoquinona LQB-118 possui efeito antitumoral em células de câncer colorretal cultivadas em monocamada e em esferóides (cultura 3d)

Gabriel Mello da Cunha Longo (IC)^{1,3}, Chaquip D. Netto², Paulo R. Costa², Raquel Maia¹, Flavia Vasconcelos¹

¹Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ.

²Laboratório de Química Bio-orgânica (LQB), IPPN, CCS, UFRJ, RJ

³Departamento de Genética, Instituto de Biologia, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CRC) é a terceira neoplasia mais comum em homens e a segunda em mulheres. Apesar do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas o sucesso do tratamento ocorre em 40 a 60% dos pacientes. O tratamento padrão para o CRC é a ressecção cirúrgica associada à quimioterapia. O principal quimioterápico utilizado no tratamento é o 5-Fluorouracil (5-FU; figura 1A), composto que induz toxicidade nos pacientes. Logo, novas estratégias terapêuticas são necessárias para garantir o sucesso do tratamento do CRC. O estudo de novas drogas tem sido pautado na utilização de linhagens celulares cultivadas em monocamada (modelo 2D). Esta abordagem perde relevância ao se tentar transpor tais resultados para modelos in vivo que consistem de massas tumorais. Neste cenário, o estudo de novas drogas mais eficazes associadas à avaliação em modelos in vitro mais próximos da organização tridimensional do tumor são necessários. Objetivos: Avaliar o efeito antitumoral dos novos compostos LQB-118 (figura 1B) e LQB-223 (figura 1C) em linhagem celular derivada de câncer colorretal e comparar ao efeito do quimioterápico 5-FU.

MATERIAIS E MÉTODOS

A linhagem celular HCT 116 derivada de CRC foi tratada com LQB-118, LQB-223 ou 5-FU por diferentes tempos e concentrações. A viabilidade celular após o tratamento foi avaliada pelo ensaio de MTT. A distribuição do ciclo celular (marcação de DNA) e a morte celular (anexina V/PI) foram avaliadas por citometria de fluxo após o tratamento com LQB-118. Para avaliação de proliferação, o ensaio clonogênico foi realizado após tratamento com LQB-118 ou 5-FU. Para estudos de citotoxicidade em cultura 3D, foram formadas colonosferas da linhagem HCT 116 pela técnica de sobreposição líquida. A cinética de crescimento e morte celular foram avaliadas após tratamento das colonosferas com LQB-118 ou 5-FU.

RESULTADOS

Após cultivo em monocamada, o 5-FU reduziu a viabilidade celular da linhagem HCT 116 de maneira tempo-dependente com inibição máxima de 50% em 72 horas (figura 2A). O máximo de redução de viabilidade obtida com o LQB-223 foi de 40% e somente em 72 horas (figura 2B). O estudo com este composto foi então descontinuado. Em contrapartida, o LQB-118 foi o composto mais eficaz tendo reduzido significativamente a viabilidade celular em menor tempo e em baixas concentrações (24h; 2,5 µM; p<0,005) (figura 2C). Adicionalmente, o LQB-118 induziu marcação de anexina V/PI (figura 3) e inibiu a formação de colônias em baixas concentrações de 1 µM e 2,5 µM (figura 5) promovendo uma discreta parada de células tratadas na fase S em 5 µM em 48 horas (figura 4). Utilizando a metodologia de cultivo em 3D, um cenário semelhante foi observado. Após 4 dias em cultura em substrato de pouca aderência, esferóides de aproximadamente 500 µm de diâmetro foram formados (figura 6). LQB-118 reduziu o crescimento dos esferóides (figura 7B) e induziu um alto percentual de células marcadas por anexina V/PI (>90%) (figura 7C). Além disso, quando tratados com LQB-118 nas concentrações de 50 µM e 100 µM, os esferóides perdem sua morfologia e se tornam fracos agregados de células (figura 8A e 8B). O 5-FU inibe o crescimento dos esferóides em concentrações a partir de 2,5 µM (figura 9). O LQB-118 induziu morte celular após curta exposição ao composto em concentrações não tóxicas para células saudáveis e órgão do sistema imune de camundongos, independente do modelo de estudo utilizado, indicando ser mais eficaz do que o 5-FU. Juntos, estes dados demonstram que o LQB-118 é eficaz contra as células de CRC tanto em cultura monocamada quanto em um modelo mais complexo como a cultura 3D sugerindo ser um composto promissor no tratamento do câncer colorretal.

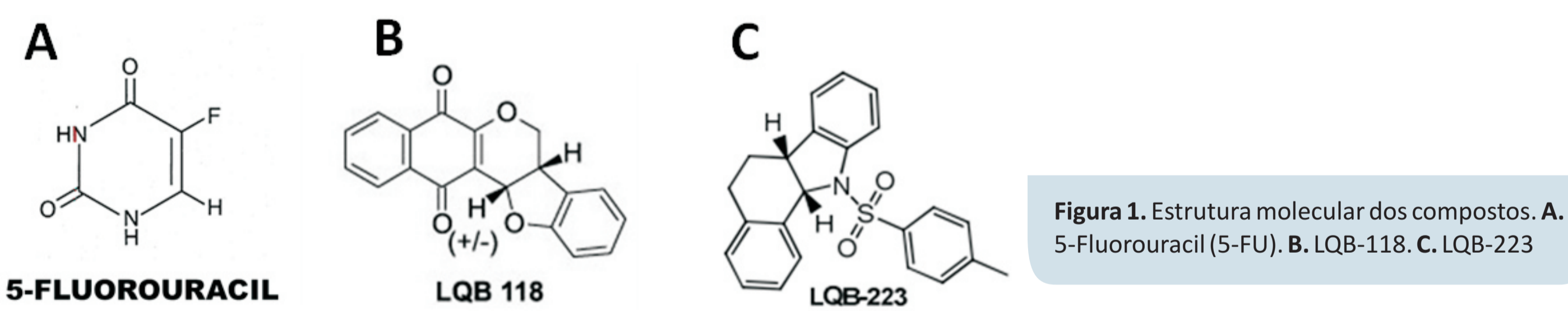


Figura 1. Estrutura molecular dos compostos. A. 5-Fluorouracil (5-FU). B. LQB-118. C. LQB-223

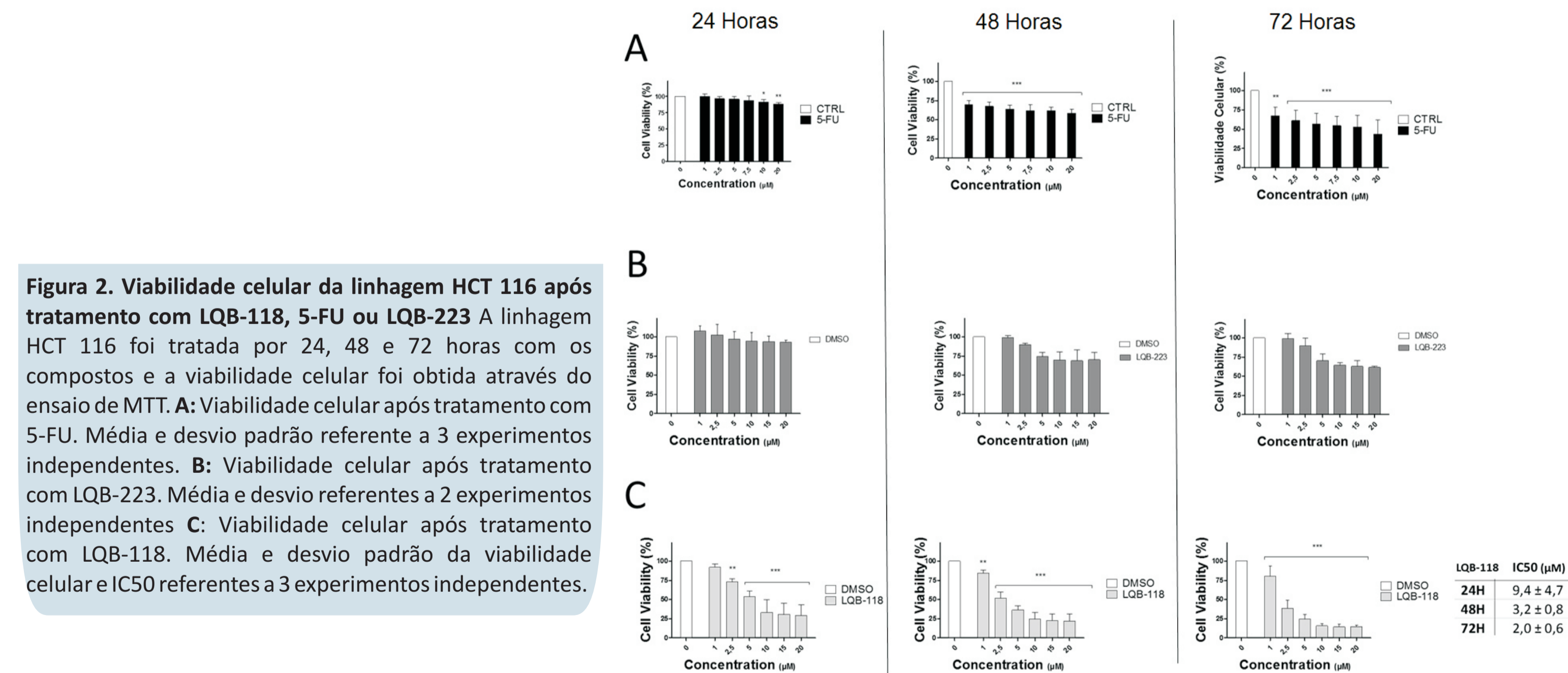


Figura 2. Viabilidade celular da linhagem HCT 116 após tratamento com LQB-118, 5-FU ou LQB-223. A: Viabilidade celular após tratamento com 5-FU. Média e desvio padrão referente a 3 experimentos independentes. B: Viabilidade celular após tratamento com LQB-223. Média e desvio referentes a 2 experimentos independentes. C: Viabilidade celular após tratamento com LQB-118. Média e desvio padrão da viabilidade celular e IC50 referentes a 3 experimentos independentes.

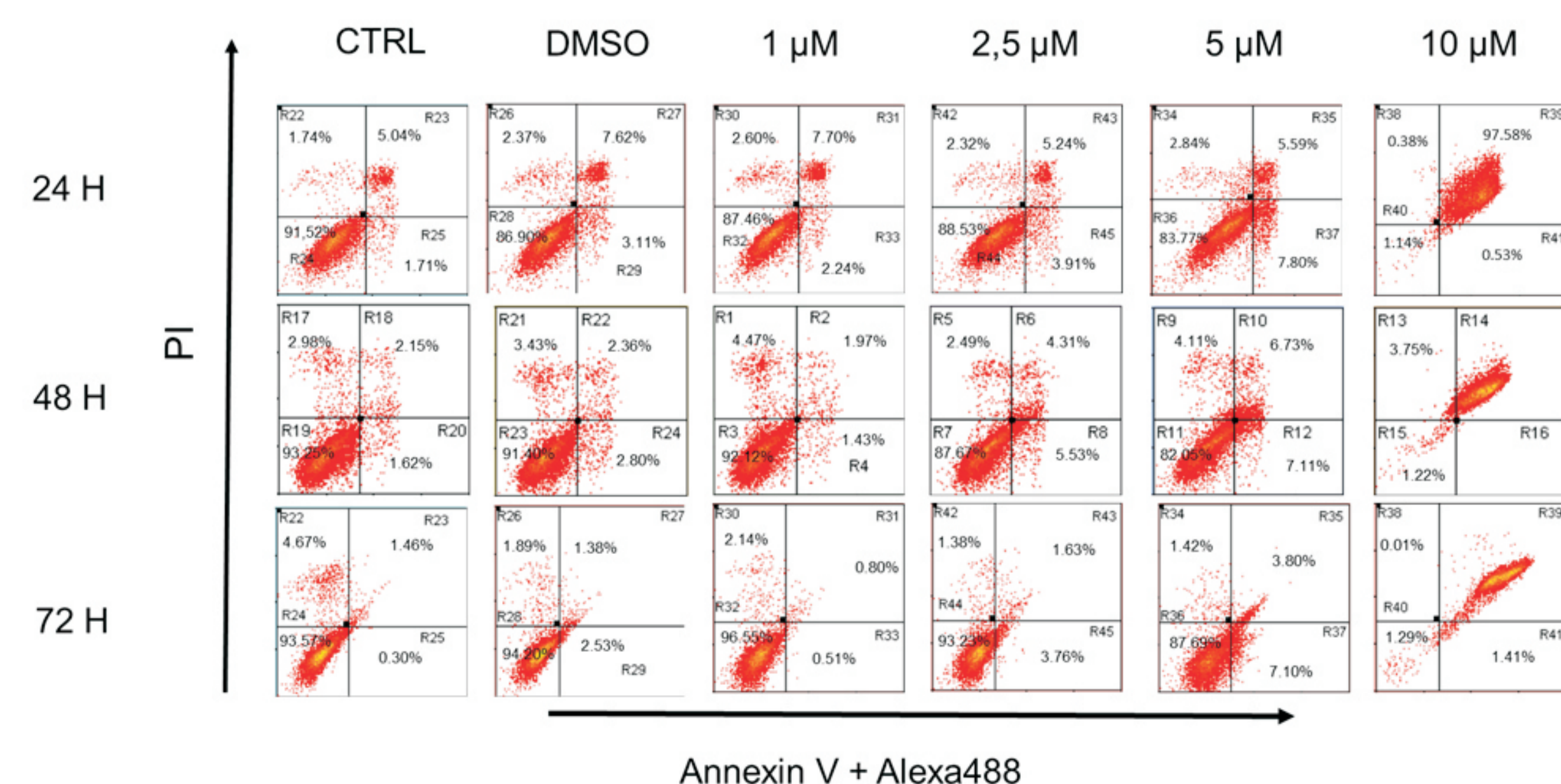


Figura 3. Avaliação de morte celular promovida pelo LQB-118. Após tratamento com diferentes concentrações de LQB-118 por 24, 48 e 72 horas, células foram incubadas com Anexina V/PI e analisadas em citômetro de fluxo.

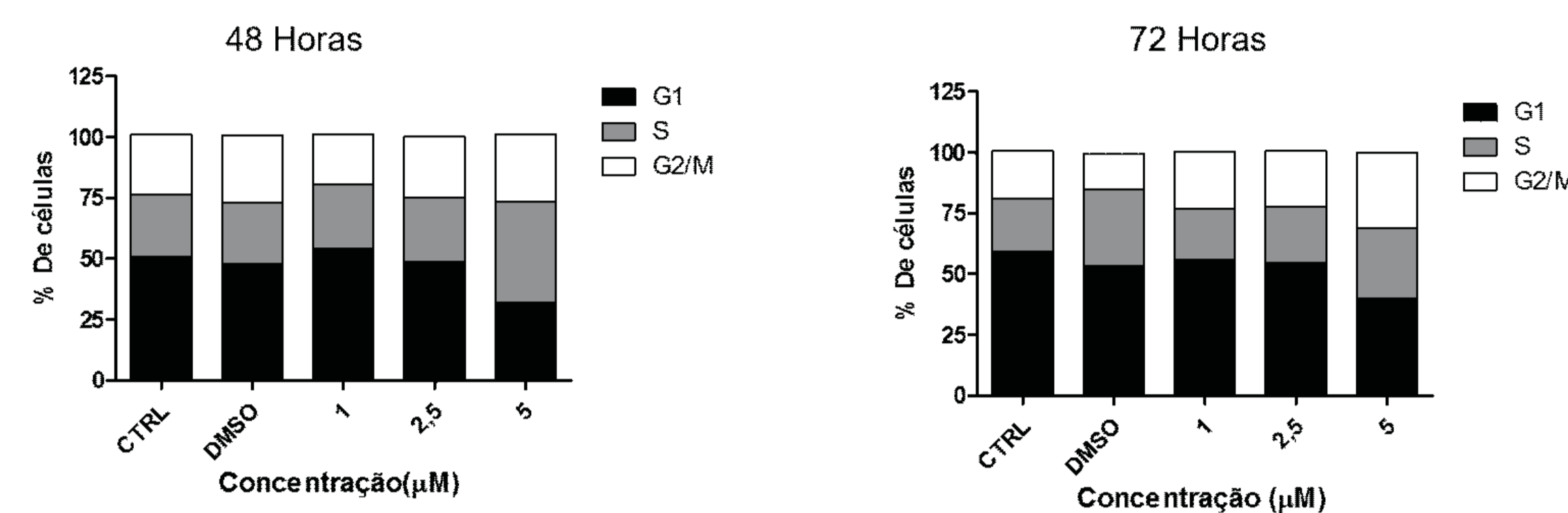


Figura 4. Distribuição das fases do ciclo celular após tratamento com LQB-118. A linhagem HCT 116 foi tratada com o composto LQB-118 em monocamada por 48 e 72 horas e o ciclo celular foi avaliado através do conteúdo de DNA. Média de 2 experimentos.

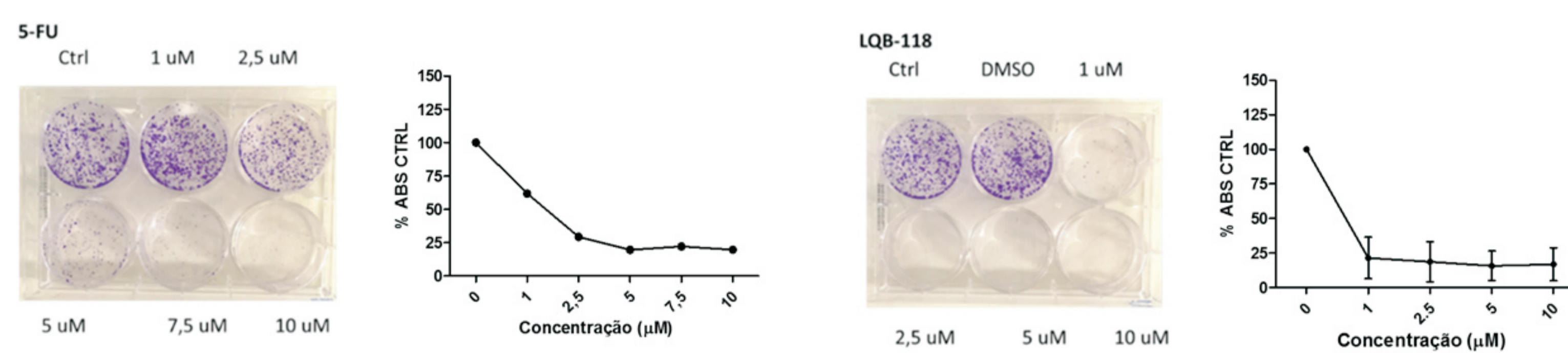


Figura 5. Ensaio clonogênico com células tratadas com LQB-118 ou 5-FU. As células foram tratadas por 24 horas. Após a remoção dos compostos a cultura foi acompanhada por aproximadamente 20 dias. As células foram então coradas com cristal violeta e dissolvidas em ácido acético. A absorvância foi analisada em espectrofotômetro. Média e desvio padrão de 2 e 3 experimentos para 5-FU e LQB-118, respectivamente.

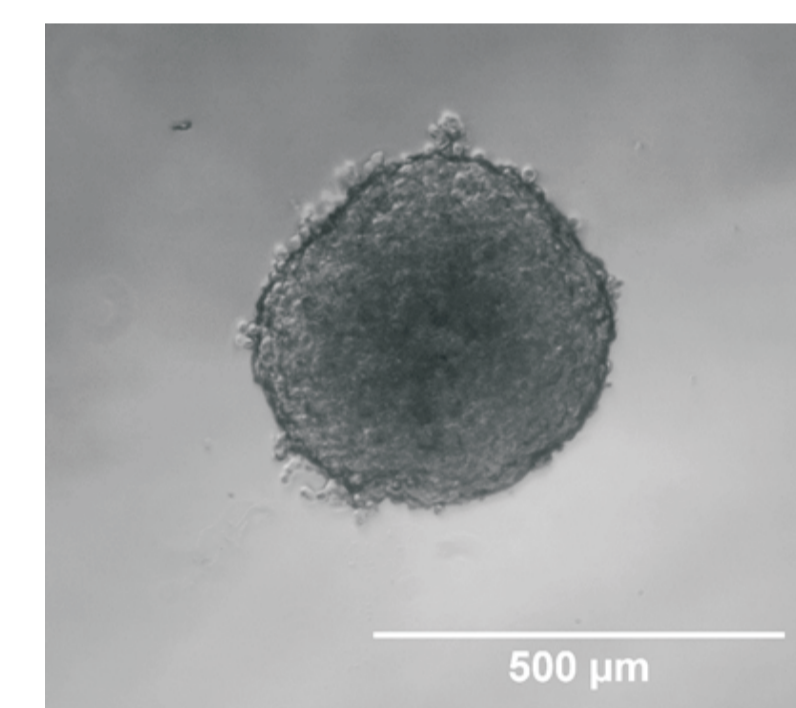


Figura 6. Imagem representativa de esfera de HCT 116. Após 4 dias em cultura em substrato de baixa aderência, a linhagem HCT 116 forma esferóides fortemente agregado de aproximadamente 500 µm de diâmetro. A cinética de crescimento é analisada levando conta o diâmetro de Feret e comparada com seu controle no tempo de 0 horas.

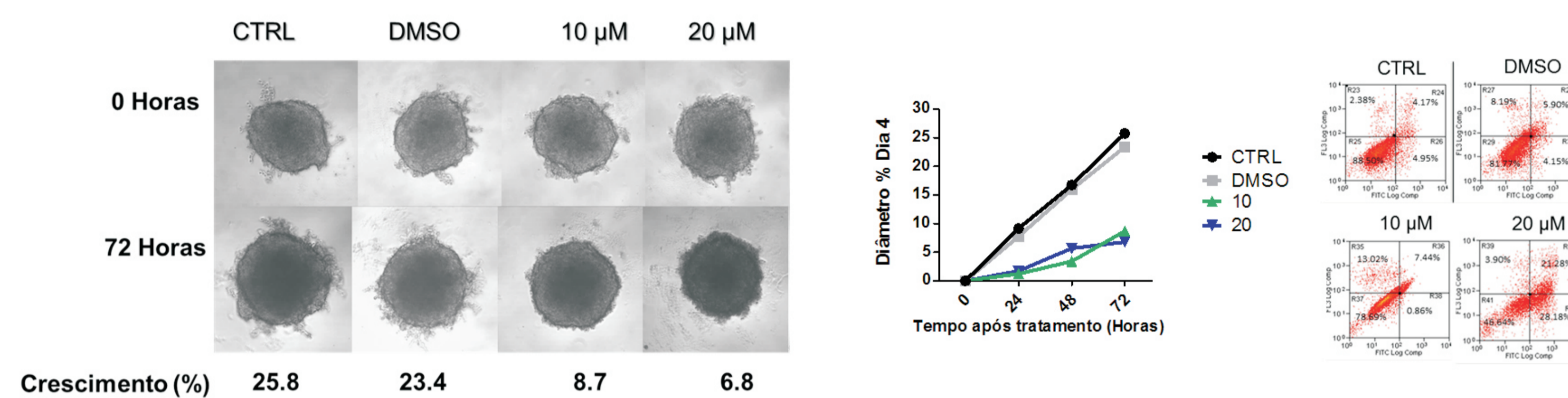


Figura 7. Cinética de crescimento de esferóides de HCT 116 após tratamento com LQB-118. Esferóides de HCT 116 foram formados e a cinética de crescimento foi avaliada durante 72 horas. A: Microscopia dos esferóides em 0 e 72 horas. Crescimento relativo do diâmetro em relação a 0 horas. B: Crescimento do diâmetro em relação a 0 horas. C: Avaliação de morte celular dos esferóides tratados em 72 horas

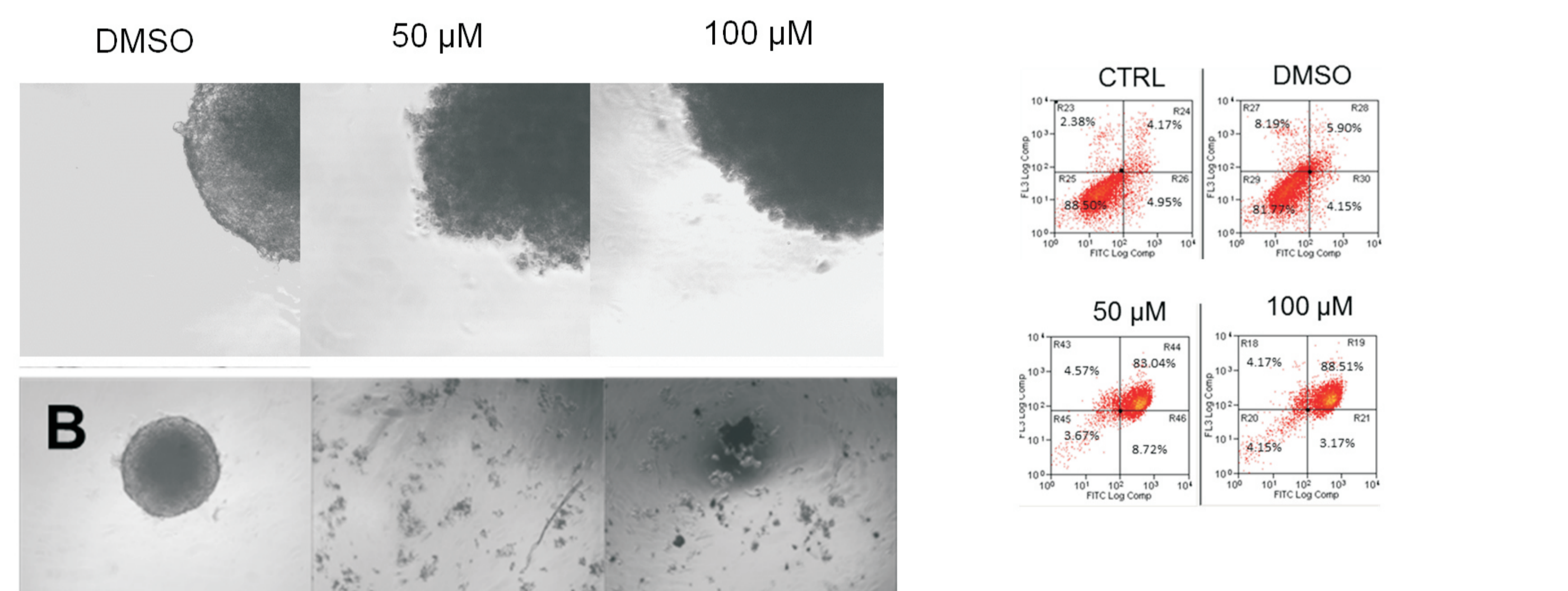


Figura 8. Morfologia, dissociação dos esferóides e ensaio de morte celular. Esferóides de HCT 116 foram tratados por 72 horas com LQB-118. A: Alteração da morfologia dos esferóides foi observada já em 24 horas. Houve perda da definição da borda apenas nos esferóides tratados. B: Células dos esferóides tratados com LQB-118 foram dissociadas após agitação mecânica. As células dos esferóides tratados com o veículo DMSO não apresentaram dissociação. C: Ensaio de detecção de morte celular com Anexina V/PI após 72 horas de incubação.

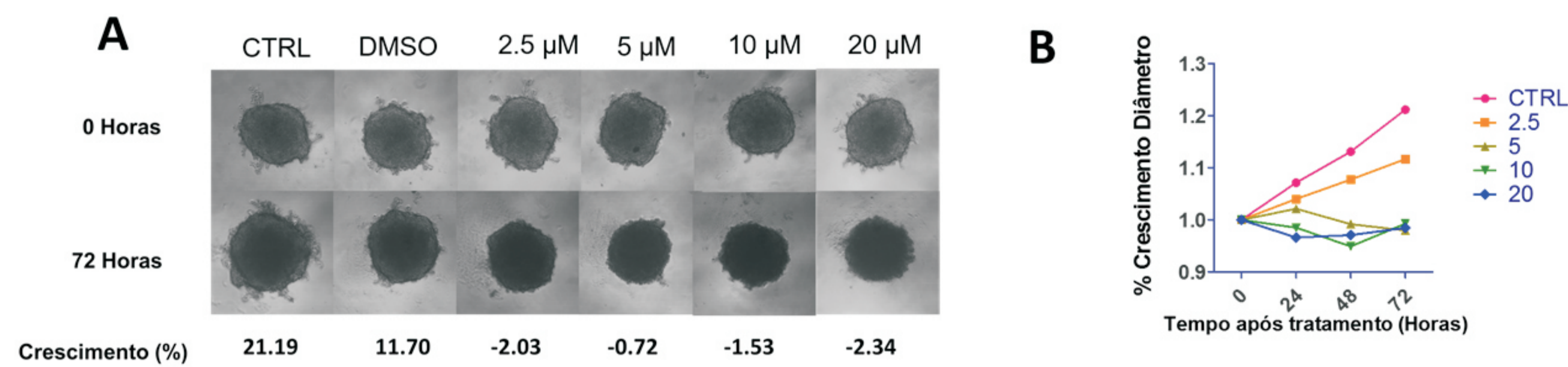


Figura 9. Cinética de crescimento de esferóides após tratamento com 5-Fluorouracil. Esferóides de HCT 116 foram tratados com 5-FU por 72 horas e a cinética de crescimento foi analisada. A: Microscopia e crescimento dos esferóides em 0 e 72 horas. B: Cinética de crescimento de esferóides tratados com 5-fluorouracil acompanhada em um intervalo de 24 horas.