

Título em Português: Novas Quimioterapias Citotóxicas para o Câncer de Mama Metastático

Título em Inglês: Novel Cytotoxic Chemotherapies for Metastatic Breast Cancer

Autor: Maynara Afonso

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Adriano Defini Andricopulo

Área de Pesquisa / SubÁrea: Biofísica Molecular

Agência Financiadora: CNPq - PIBITI

NOVAS QUIMIOTERAPIAS CITOTÓXICAS PARA O CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO

Maynara Afonso

Matheus da Silva Souza

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo

maynara.afonso@usp.br

Objetivos

(i) *Screening* de compostos sintéticos, híbridos das classes quinazolina e chalcona, a partir de ensaios *in vitro* de proliferação celular em linhagem de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), com subsequente determinação da concentração citotóxica (CC_{50}) em célula não-tumoral (fibroblasto humano, HFF-1). (ii) Verificação da capacidade de inibição da migração celular de moléculas selecionadas em ensaios quantitativos *wound healing*. (iii) Investigação da atividade de modulação das melhores moléculas em relação à proteína tubulina por meio de ensaios de polimerização *in vitro* e de competitividade pelo sítio da colchicina.

Métodos e Procedimentos

A avaliação da viabilidade celular foi realizada mediante ensaio colorimétrico de redução da resazurina em resorufina em células viáveis ($\lambda_{\text{emissão}} = 588 \text{ nm}$). Os valores de IC_{50} e CC_{50} foram determinados pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste com o auxílio do software GraphPad Prism 8. A capacidade de inibição da migração das células foi analisada por ensaios *wound healing* tipo concentração única a $10 \mu\text{M}$. As áreas das fendas foram obtidas pelo software ImageJ. Para avaliar a capacidade dos compostos em modular a ação

da proteína tubulina foi usado um *kit* contendo 10 mg de tubulina liofilizada purificada de cérebro de porco (pureza > 99%), alíquotas de GTP, paclitaxel, DMSO e soluções tamponantes específicas para reconstituição (*buffer 1*) e polimerização (glicerol) da proteína. Visando investigar a hipótese de modulação do sítio da colchicina na proteína tubulina pelas amostras, foram realizados ensaios de competição para este sítio. Para isso, a tubulina ($4 \mu\text{M}$), proveniente do *kit* empregado no ensaio de polimerização, foi misturada com colchicina ($4 \mu\text{M}$). A mistura resultante foi incubada com quatro concentrações ($25 / 5 / 1$ e $0,2 \mu\text{M}$) dos compostos ou dos controles (positivo: podofilotoxina; ou negativos: paclitaxel ou vimblastina) em *buffer 1* em placas pretas de 96 poços a 37°C por 1h. Leituras de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 365 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 435 \text{ nm}$) foram registradas com o uso do fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Resultados

Os compostos que apresentaram perfil citotóxico promissor com $IS > 5$, AQC-02 e AQC-06, passaram por ensaio *wound healing* no qual ambos apresentaram capacidade anti-migratória em concentração única de $10 \mu\text{M}$ levando a investigação em diversas concentrações para identificar uma relação

concentração x efeito, onde se concluiu que em maiores concentrações a inibição da migração é maior. No ensaio de polimerização *in vitro* da tubulina foi possível verificar que os compostos atuam na modulação dos microtúbulos. Os compostos foram submetidos a ensaios de competitividade para elucidar se o mecanismo de modulação da tubulina poderia estar fundamentado na interação com o sítio da colchicina. Como reportado pela **Figura 1**, a competição entre os ligantes e a colchicina resultou na redução da fluorescência do complexo colchicina-tubulina, demonstrando possíveis interações com este sítio.

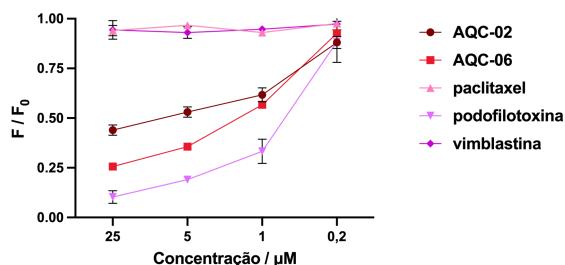


Figura 1: Competição dos híbridos quinazolina-chalcona pelo sítio da colchicina.

Conclusões

As séries de moléculas híbridas estudadas representam uma inovação em termos estruturais e de propriedades anticâncer. Os compostos AQC-02 e AQC-06 se destacaram entre os demais, pois exibiram considerável perfil de seletividade citotóxica com valores de IS maiores que 5 frente HFF-1. A partir dos ensaios de caracterização dos compostos foi possível verificar que ambos atuam como inibidores da polimerização da tubulina, e atuam no sítio da colchicina. As características encontradas nos compostos são muito importantes, a capacidade de inibir a formação dos microtúbulos impede que as células cancerígenas se multipliquem, o que é imprescindível visando a eliminação do câncer. O sítio da colchicina na tubulina é um sítio muito importante pois as moléculas que interagem com ele geralmente são menores e menos complexas, facilitando estágios avançados do planejamento de um fármaco

anticâncer. Portanto, tendo em vista as características favoráveis dos híbridos podem ser elaboradas modificações estruturais para melhorar a seletividade dos compostos e a capacidade de inibição da proliferação e migração celular.

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos e Laboratório de Química Medicinal, por permitirem que o projeto fosse desenvolvido. Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, ao Prof. Dr. Dennis Russowsky e sua equipe, pela síntese dos híbridos de quinazolina-chalcona. Ao apoio da agência de fomento para realização do presente trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 138066/2022-1.

Referências

- [1] SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.
- [2] HARBECK, Nadia *et al.* Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134-1150, 2017.
- [3] MASS, Eduardo B. *et al.* The quinazoline-chalcone and quinazolinone-chalcone hybrids: a promising combination for biological activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 186-203, 2021.

NEW CYTOTOXIC CHEMOTHERAPIES FOR METASTATIC BREAST CANCER

Maynara Afonso

Matheus da Silva Souza

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

São Carlos Institute of Physics / University of São Paulo

maynara.afonso@usp.br

Objectives

(i) Screening of synthetic compounds, hybrids of the quinazoline and chalcone classes, from in vitro cell proliferation assays in a triple negative breast cancer cell line (MDA-MB-231), with subsequent determination of the cytotoxic concentration (CC_{50}) in the non-tumor cell (human fibroblast, HFF-1). (ii) Verification of the cell migration inhibition capacity of selected molecules in quantitative wound healing assays. (iii) Investigation of the modulation activity of the best molecules in relation to the tubulin protein through in vitro polymerization assays and competitiveness by the colchicine site.

Materials and Methods

Cell viability was evaluated using a colorimetric assay for the reduction of resazurin to resorufin in viable cells ($\lambda_{\text{emission}} = 588 \text{ nm}$). IC_{50} and CC_{50} values were determined by the best fit non-linear regression method with the aid of the GraphPad Prism 8 software. The ability to inhibit cell migration was analyzed by single concentration wound healing assays at $10 \mu\text{M}$. The areas of the slits were obtained using the ImageJ software. To evaluate the ability of the compounds to modulate the action of the

tubulin protein, a kit containing 10 mg of lyophilized tubulin purified from pig brain (purity > 99%), aliquots of GTP, paclitaxel, DMSO and specific buffering solutions for reconstitution (buffer 1) and polymerization (glycerol) of the protein. Aiming to investigate the hypothesis of modulation of the colchicine site in the tubulin protein by the samples, competition assays were carried out for this site. For this, tubulin ($4 \mu\text{M}$), from the kit used in the polymerization assay, was mixed with colchicine ($4 \mu\text{M}$). The resulting mixture was incubated with four concentrations ($25 / 5 / 1$ and $0.2 \mu\text{M}$) of compounds or controls (positive: podophyllotoxin; or negative: paclitaxel or vinblastine) in buffer 1 in 96-well black plates at 37°C for 1h. Fluorescence readings ($\lambda_{\text{excitation}} = 365 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emission}} = 435 \text{ nm}$) were recorded using a SpectraMax Gemini EM fluorimeter (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Results

The compounds that showed a promising cytotoxic profile with $IS > 5$, AQC-02 and AQC-06, underwent a wound healing assay in which both showed anti-migratory capacity at a single concentration of $10 \mu\text{M}$, leading to investigation at different concentrations to identify a concentration x effect relation, where it was concluded that at higher concentrations

the inhibition of migration is greater. In the *in vitro* tubulin polymerization test, it was possible to verify that the compounds act in the modulation of microtubules. The compounds were submitted to competitiveness assays to elucidate whether the tubulin modulation mechanism could be based on the interaction with the colchicine site. As reported by **Figure 1**, competition between the ligands and colchicine resulted in reduced fluorescence of the colchicine-tubulin complex, demonstrating possible interactions with this site.

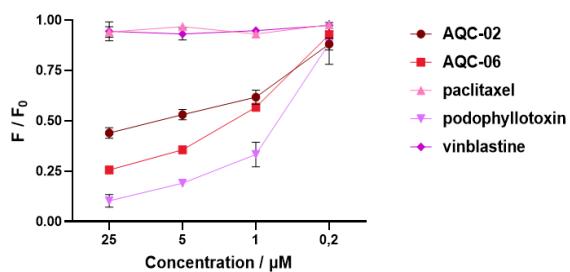


Figure 1: Competition of quinazoline-chalcone hybrids for the colchicine site.

Conclusions

The series of hybrid molecules studied represent an innovation in terms of structure and anticancer properties. Compounds AQC-02 and AQC-06 stood out among the others, as they exhibited a considerable profile of cytotoxic selectivity with IS values greater than 5 against HFF-1. From the characterization tests of the compounds, it was possible to verify that both act as tubulin polymerization inhibitors, and act on the colchicine site. The characteristics found in the compounds are very important, the ability to inhibit the formation of microtubules prevents cancer cells from multiplying, which is essential in order to eliminate cancer. The colchicine site on tubulin is a very important site because the molecules that interact with it are generally smaller and less complex, facilitating advanced stages of anticancer drug design. Therefore, in view of the favorable characteristics of the hybrids, structural modifications can be made to improve

the selectivity of the compounds and the ability to inhibit cell proliferation and migration.

Acknowledgements

To the University of São Paulo, Institute of Physics of São Carlos and Laboratory of Medicinal Chemistry, for allowing the project to be developed. To my advisor, Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, to Prof. Dr. Dennis Russowsky and his team, for the synthesis of quinazoline-chalcone hybrids. To the support of the funding agency for carrying out this work: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) - Process 138066/2022-1.

References

- [1] SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.
- [2] HARBECK, Nadia *et al.* Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134-1150, 2017.
- [3] MASS, Eduardo B. *et al.* The quinazoline-chalcone and quinazolinone-chalcone hybrids: a promising combination for biological activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 186-203, 2021.