

Título em Português: Screening de Compostos em Linhagem Tumoral Metastática de Próstata

Título em Inglês: Screening of Compounds in Metastatic Prostate Cancer Cell Line

Autor: Felipe Ribaldo Ferreira da Costa

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Adriano Defini Andricopulo

Área de Pesquisa / SubÁrea: Farmacologia Bioquímica e Molecular

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

SCREENING DE COMPOSTOS EM LINHAGEM TUMORAL METASTÁTICA DE PRÓSTATA

Felipe Ribaldo Ferreira da Costa

Matheus da Silva Souza

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo

feliperfc@estudante.ufscar.br

Objetivos

(i) *Screening* de compostos sintéticos, híbridos das classes quinazolina e chalcona, a partir de ensaios *in vitro* de proliferação celular em linhagem metastática de próstata (DU-145), com subsequente determinação da concentração citotóxica (CC₅₀) em célula não-tumoral (fibroblasto humano, HFF-1). (ii) Avaliação do processo migratório por meio de ensaios *wound healing* e *transwell* baseado em câmara de Boyden.

Métodos e Procedimentos

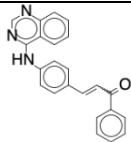
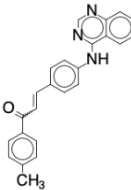
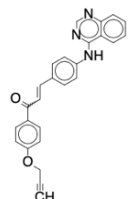
A avaliação da viabilidade celular foi realizada mediante ensaio colorimétrico de redução da resazurina em resorufina em células viáveis ($\lambda_{\text{emissão}} = 588 \text{ nm}$). Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram determinados pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste com o auxílio do software *GraphPad Prism 8*. A capacidade de inibição da migração das células foi analisada por ensaios *wound healing* tipo concentração única ($\geq 50 \%$ a $10 \mu\text{M}$) e dose-resposta (a 5 e $1 \mu\text{M}$). As áreas das fendas foram obtidas pelo software *ImageJ*. A quantificação do efeito fenotípico foi realizada seguindo os princípios da câmara de Boyden em um ensaio *transwell* com o kit QCM™ 8 μm 96-well *Chemotaxis Cell Migration Assay* (Merck-Millipore®, Temecula, CA, USA).

Resultados

Os resultados apontaram que os compostos AQC-02 (1), AQC-04 (2) e AQC-08 (3)

inviabilizam seletivamente a linhagem tumoral de próstata frente os fibroblastos saudáveis, exibindo índices de seletividade superiores a 9. Os compostos **1–3** apresentam ainda atividade antimigratória em termos quali- e quantitativos, com valores de IC₅₀ em torno de $6 \mu\text{M}$. Com isto, eles são promissores para prosseguir para ensaios bioquímicos *in vitro* a fim de avaliar os efeitos sobre a modulação da polimerização da proteína-alvo tubulina.

Tabela 1: Valores de IC₅₀ (μM) e de seletividade.

CÓDIGO	ESTRUTURA	IC ₅₀ * / DU	CC ₅₀ * / HFF	IS**
1		5,27 ± 1,05	47,55 ± 4,48	9,02
2		6,65 ± 0,36	>100	>15,04
3		5,85 ± 0,64	>100	>17,09

*Média ± desvio-padrão de três ensaios independentes.

**Índice de seletividade (IS) = CC₅₀^{HFF-1} / IC₅₀^{DU-145}.

Tabela 2: Resultados dos ensaios de migração em DU-145.

CÓDIGO	WH* / % INIBIÇÃO	TRANSWELL – IC ₅₀ / μ M
1	64,71 $\pm$ 0,74	5,22 $\pm$ 0,50
2	55,98 $\pm$ 1,10	6,76 $\pm$ 0,78
3	60,77 $\pm$ 0,84	5,70 $\pm$ 0,65

*WH = wound healing.

Resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão de dois ensaios independentes.

Conclusões

Neste trabalho de Iniciação Científica, estamos desenvolvendo novos candidatos a agentes antitumorais por meio da integração de métodos em química medicinal. O planejamento de novos compostos tem como base uma série sintética constituída por híbridos seletivos e inibidores do processo migratório. Modificações moleculares foram toleradas nos representantes dos modelos e, apesar da potência em linhagem tumoral tenha se mantido na mesma ordem, as alterações de um tolueno (**1**) por um *p*-xileno em (**2**) e por *p*-propargiloxitolueno em (**3**) levaram concomitantemente ao aumento da seletividade em fibroblastos saudáveis (CC₅₀ > 100 μ M) e a manutenção da atividade migratória (não-deletérias para tal característica). Todos estes resultados catalogados contribuirão para a proposição de novas sínteses.

Referências Bibliográficas

- [1] FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016-1036, 2017.
- [2] DEVI TANGUTUR, A. *et al.* Microtubule targeting agents as cancer chemotherapeutics: an overview of molecular hybrids as stabilizing and destabilizing agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 2523-2537, 2017.
- [3] KERRU, N. *et al.* Recent advances (2015-2016) in anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 179-212, 2017.

SCREENING OF COMPOUNDS IN METASTATIC PROSTATE CANCER CELL LINE

Felipe Ribaldo Ferreira da Costa

Matheus da Silva Souza

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

São Carlos Institute of Physics / University of São Paulo

feliperfc@estudante.ufscar.br

Objectives

(i) Screening of synthetic compounds, hybrids of the quinazoline and chalcone classes, from *in vitro* cell proliferation assays in a metastatic prostate cancer cell line (DU-145), with subsequent determination of the cytotoxic concentration (CC₅₀) in non-tumor cell (human fibroblast, HFF-1). (ii) Evaluation of the migration process through wound healing assay and Boyden chamber-based transwell assay.

Materials and Methods

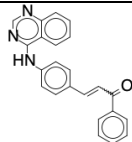
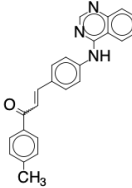
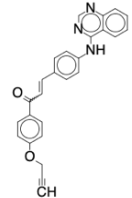
The evaluation of cell viability was performed through a colorimetric assay based on the reduction of resazurin to resorufin in viable cells ($\lambda_{\text{emission}} = 588 \text{ nm}$). IC₅₀ and CC₅₀ values were determined by the best-fit nonlinear regression method with the aid of the GraphPad Prism 8 software. The capacity to inhibit cell migration was analyzed by single concentration ($\geq 50 \%$ at $10 \mu\text{M}$) and dose-response (at 5 and $1 \mu\text{M}$) wound healing assays. Crack areas were obtained by ImageJ software. The quantification of the phenotypic effect was performed following Boyden chamber principles in a transwell assay with the QCM™ $8 \mu\text{m}$ 96-well Chemotaxis Cell Migration Assay kit (Merck-Millipore®, Temecula, CA, USA).

Results

The results showed that the compounds AQC-02 (1), AQC-04 (2) and AQC-08 (3) selectively

incapacitate the prostate cancer cell line against healthy fibroblasts, exhibiting selectivity indexes higher than 9. Compounds **1–3** also show antimigratory activity in qualitative and quantitative terms, with IC₅₀ values around $6 \mu\text{M}$. With this, they are promising to proceed to *in vitro* biochemical assays in order to evaluate the effects on modulation of the polymerization of the target protein tubulin.

Table 1: IC₅₀ (μM) and selectivity values.

CODE	STRUCTURE	IC ₅₀ * / DU	CC ₅₀ * / HFF	SI**
1		5.27 ± 1.05	47.55 ± 4.48	9.02
2		6.65 ± 0.36	>100	>15.04
3		5.85 ± 0.64	>100	>17.09

*Mean $\pm$ standard deviation of three independent assays.

**Selectivity index (SI) = $\text{CC}_{50}^{\text{HFF-1}} / \text{IC}_{50}^{\text{DU-145}}$.

Table 2: Results of migration assays in DU-145.

CODE	WH* / % INHIBITION	TRANSWELL – IC ₅₀ / μ M
1	64.71 $\pm$ 0.74	5.22 $\pm$ 0.50
2	55.98 $\pm$ 1.10	6.76 $\pm$ 0.78
3	60.77 $\pm$ 0.84	5.70 $\pm$ 0.65

*WH = wound healing.

Results presented as mean $\pm$ standard deviation of two independent assays.

Conclusions

In this Scientific Initiation work, we are developing new candidates for antitumor agents through the integration of methods in medicinal chemistry. The planning of new compounds is based on a synthetic series consisting of selective hybrids and inhibitors of the migratory process. Molecular modifications were tolerated in the representatives of the models and, despite the potency in tumor cell line having remained in the same order, the alterations of a toluene (**1**) by a *p*-xylene in (**2**) and by *p*-propargyloxytoluene in (**3**) led concomitantly with the increase in selectivity in healthy fibroblasts (CC₅₀ > 100 μ M) and the maintenance of the migratory activity (non-detrimental for this characteristic). All these cataloged results will contribute to the proposition of new syntheses.

References

- [1] FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016-1036, 2017.
- [2] DEVI TANGUTUR, A. *et al.* Microtubule targeting agents as cancer chemotherapeutics: an overview of molecular hybrids as stabilizing and destabilizing agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 2523-2537, 2017.
- [3] KERRU, N. *et al.* Recent advances (2015-2016) in anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 179-212, 2017.