

Título em Português: Triagem de Compostos Bioativos em Linhagem Tumoral Metastática de Próstata

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

Autor: Larissa Daniela Dias Rafael

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

TRIAGEM DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM LINHAGEM TUMORAL METASTÁTICA DE PRÓSTATA

Larissa Daniela Dias Rafael

Matheus da Silva Souza

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo

larissaddias.rafael@usp.br

Objetivos

(i) Determinação da seletividade de compostos bioativos frente células da linhagem tumoral metastática de próstata (DU-145) a partir de ensaios de viabilidade celular em fibroblastos não-tumorais de fígado de camundongo (FC3H). **(ii)** Avaliação da capacidade de modulação da polimerização *in vitro* da proteína-alvo tubulina. Dessa forma, este projeto visou a identificação de novos ligantes candidatos a terapias para o tratamento do câncer de próstata (CaP).

Métodos e Procedimentos

A viabilidade celular foi avaliada mediante redução do indicador resazurina em resorufina por enzimas mitocondriais de células viáveis ($\lambda_{emissão} = 588$ nm), empregando o fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, US). A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada com o software GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., US), baseando-se no método de regressão não-linear de melhor ajuste.

A modulação *in vitro* do alvo molecular tubulina foi acessada via ensaio de sua polimerização em microtúbulos (MTs) utilizando-se o *kit* da Cytoskeleton Inc. (US) – o qual é baseado na fluorescência do DAPI. Este composto possui a capacidade de se incorporar aos MTs com uma afinidade muito maior do que a dímeros livres.

Resultados

Com base em dados de trabalhos anteriores, três híbridos de quinazolina-chalcona foram selecionados por se mostrarem ativos em DU-145 e seletivos frente fibroblastos não-tumorais humanos (HFF-1). Tais moléculas também apresentaram atividade antimigratória em ensaios qualitativos. Motivados por esta triagem preliminar, a investigação destes compostos foi ampliada para avaliação da seletividade em FC3H.

Os resultados evidenciaram que os híbridos pré-triados também foram capazes de inviabilizar seletivamente DU-145 frente fibroblastos murinos não-tumorais, contando com $IS > 15$ (Tabela 1). Desse modo, os compostos prosseguiram para ensaios bioquímicos com a proteína-alvo.

Tabela 1: Valores de seletividade citotóxica das amostras avaliadas.

Amostras	$IC_{50} \pm DP^a$ (μM)	$CC_{50} \pm DP^a$ (μM)	IS^b
	DU-145	FC3H	
1	5,27 ± 1,05	> 100	> 19
2	6,65 ± 0,36	> 100	> 15
3	5,85 ± 0,64	> 100	> 17
Colchicina	0,014 ± 0,002	0,019 ± 0,001	1

^a Média ± desvio-padrão de três ensaios independentes.

^b Índice de seletividade = $CC_{50}^{FC3H}/IC_{50}^{DU-145}$.

Os ensaios de modulação *in vitro* permitiram a identificação de perfis singulares associados à atividade de agentes desestabilizadores e estabilizadores de MTs para controles (Figura 1). O screening em concentração única possibilitou a caracterização dos compostos como inibidores de polimerização da tubulina.

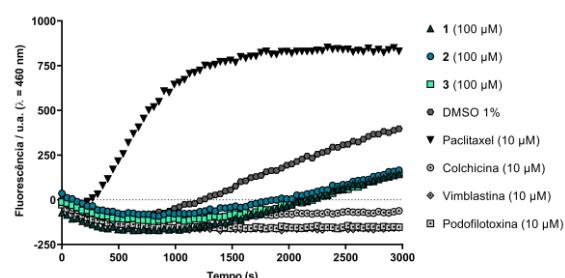


Figura 1: Perfis de modulação da proteína tubulina nos ensaios de polimerização *in vitro*.

A determinação dos valores de IC_{50} (Tabela 2) mostrou que as substituições dos grupamentos R_2 entre os híbridos promoveram uma diminuição na potência de inibição da polimerização. Todavia, tais mudanças não impactaram nos valores de citotoxicidade em DU-145.

Ainda que diferenças expressivas não tenham sido verificadas nos ensaios celulares e de modulação do alvo, tais substituições estruturais consistem em contribuições relevantes para a otimização destas moléculas, uma vez que a potência se manteve na ordem de micromolar em todos os ensaios.

Tabela 2: Valores de IC_{50} de polimerização *in vitro* da proteína tubulina.

Amostras	Polimerização da Tubulina	
	IC_{50} EC_{50}^b \pm DP (μM) ^a	
1	$5,71 \pm 0,09$	
2	$9,04 \pm 0,40$	
3	$8,40 \pm 0,31$	
Paclitaxel	$1,87 \pm 0,10^b$	
Colchicina	$0,99 \pm 0,03$	
Vimblastina	$0,17 \pm 0,01$	
Podofilotoxina	$0,36 \pm 0,01$	

^a Média \pm desvio-padrão de ensaios independentes em duplícata.

^b Potência de promoção da polimerização.

Conclusões

O presente trabalho de Iniciação Científica se dedicou à triagem de compostos terapêuticos para o tratamento do CaP. Concluiu-se que os híbridos 1-3 apresentam evidente seletividade citotóxica para DU-145 frente FC3H ($IS > 15$). Além disso, demonstrou-se que tais moléculas são capazes de modular a tubulina *in vitro*, inibindo sua polimerização em microtúbulos com valores promissores ($IC_{50} \leq 10 \mu M$).

O estudo destes compostos de grande diversidade química forneceu informações importantes sobre padrões estruturais relevantes para a proposição de novas sínteses, visando a inibição de comportamentos associados à manifestação e progressão tumoral. Assim, a investigação destes híbridos destacou-se por seu ineditismo, sobretudo na área de descoberta de novos fármacos para o tratamento do CaP metastático.

Referências Bibliográficas

- [1] WANG, G. et al. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes & Development**, v. 32, n. 17-18, p. 1105-1140, 2018.
- [2] SHUAI, W. et al. Recent progress on tubulin inhibitors with dual targeting capabilities for cancer therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 12, p. 7963-7990, 2021.
- [3] AUTI, P. S.; GEORGE, G.; PAUL, A. T. Recent advances in the pharmacological diversification of quinazoline/quinazolinone hybrids. **RSC Advances**, v. 10, n. 68, p. 41353-41392, 2020.

SCREENING OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN METASTATIC PROSTATE CANCER CELL LINE

Larissa Daniela Dias Rafael

Matheus da Silva Souza

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

São Carlos Institute of Physics / University of São Paulo

larissaddias.rafael@usp.br

Objectives

(i) Determination of selectivity of bioactive compounds against metastatic prostate cancer cell line (DU-145) from cell viability assays in mouse liver non-tumor fibroblasts (FC3H). (ii) Evaluation of the capability to modulate *in vitro* polymerization of the target protein tubulin. Thus, this project aimed to identify new candidate ligands for therapies for the treatment of prostate cancer (PC).

Materials and Methods

Cell viability was evaluated through reducing the indicator resazurin to resorufin by mitochondrial enzymes of viable cells ($\lambda_{\text{emission}} = 588$ nm), using the SpectraMax Gemini EM fluorimeter (Molecular Devices, US). The determination of IC_{50} and CC_{50} values was performed applying the GraphPad Prism 8.2.1 software (GraphPad Software Inc., US), based on the best-fit nonlinear regression method.

The *in vitro* modulation of the molecular target tubulin was assessed through assay of its polymerization in microtubules (MTs), utilizing the Cytoskeleton Inc. (US) kit – which is based on DAPI fluorescence. This compound has the ability to incorporate into MTs with a higher affinity than to free dimers.

Results

Based on data from previous works, three quinazoline-chalcone hybrids were selected for being active in DU-145 and selective against human non-tumor fibroblasts (HFF-1). Such

molecules also showed anti-migratory activity in qualitative assays. Motivated by this preliminary screening, the investigation of these compounds was extended to evaluate the selectivity in FC3H.

The results showed that the pre-screened hybrids were also able to selectively incapacitate DU-145 against murine non-tumor fibroblasts with $SI > 15$ (Table 1). Therefore, the compounds proceeded to biochemical assays with the target protein.

Table 1: Cytotoxic selectivity values of the evaluated samples.

Samples	$IC_{50} \pm SD^a$ (μM)		SI^b
	DU-145	FC3H	
1	5.27 ± 1.05	> 100	> 19
2	6.65 ± 0.36	> 100	> 15
3	5.85 ± 0.64	> 100	> 17
Colchicine	0.014 ± 0.002	0.019 ± 0.001	1

^a Mean \pm standard deviation of three independent assays.

^b Selectivity index = $CC_{50}^{\text{FC3H}}/IC_{50}^{\text{DU-145}}$.

In vitro modulation assays allowed the identification of characteristic profiles associated with the activity of microtubule destabilizing and stabilizing agents for controls (Figure 1). Single concentration screening enabled to characterize the compounds as tubulin polymerization inhibitors.

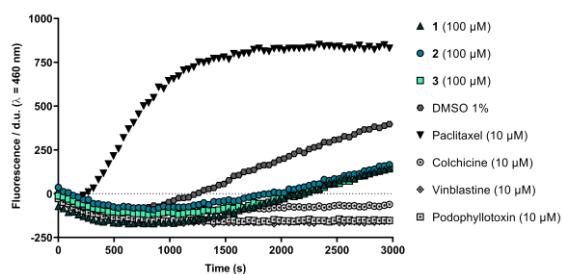


Figure 1: Profiles of protein tubulin modulation in *in vitro* polymerization assays.

The determination of IC_{50} values (Table 2) showed that the substitutions of the R_2 groups between the hybrids promoted a decrease in the potency of polymerization inhibition. However, such changes did not impact the cytotoxicity values in DU-145.

Although expressive differences were not verified in the cellular assays and target modulation ones, such structural substitutions are relevant contributions to the optimization of these molecules, since the potency remained in the micromolar order in all assays.

Table 2: IC_{50} values of *in vitro* polymerization of the protein tubulin.

Samples	Tubulin Polymerization	
	IC_{50} EC_{50}^b \pm SD (μM) ^a	
1	5.71 ± 0.09	
2	9.04 ± 0.40	
3	8.40 ± 0.31	
Paclitaxel	1.87 ± 0.10^b	
Colchicine	0.99 ± 0.03	
Vinblastine	0.17 ± 0.01	
Podophyllotoxin	0.36 ± 0.01	

^a Mean \pm standard deviation of independent assays in duplicate.

^b Polymerization promoting potency.

Conclusions

The present Scientific Initiation work was dedicated to the screening of therapeutic compounds for the treatment of PC. It was concluded that hybrids 1-3 show evident cytotoxic selectivity for DU-145 against FC3H (SI > 15). Furthermore, it was demonstrated that such molecules are able to modulate tubulin *in vitro*, inhibiting its polymerization in microtubules with promising values ($IC_{50} \leq 10 \mu M$).

The study of these compounds of great chemical diversity provided important information about relevant structural patterns for the proposition of new syntheses, aiming at the inhibition of behaviors associated with tumor manifestation and progression. Thus, the investigation of these hybrids stood out for its originality, especially in the area of discovery of new drugs for the treatment of metastatic PC.

References

- [1] WANG, G. *et al.* Genetics and biology of prostate cancer. **Genes & Development**, v. 32, n. 17-18, p. 1105-1140, 2018.
- [2] SHUAI, W. *et al.* Recent progress on tubulin inhibitors with dual targeting capabilities for cancer therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 12, p. 7963-7990, 2021.
- [3] AUTI, P. S.; GEORGE, G.; PAUL, A. T. Recent advances in the pharmacological diversification of quinazoline/quinazolinone hybrids. **RSC Advances**, v. 10, n. 68, p. 41353-41392, 2020.