

Trabalho

Título em Português:	Investigação dos Efeitos Citotóxicos de Novos Compostos Sintéticos em Células Tumorais de Mama e Próstata
Título em Inglês:	Investigation of the Cytotoxic Effects of New Synthetic Compounds on Breast and Prostate Tumor Cells
Autor:	Tayla Hiroki Kawatoko
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



Investigação dos Efeitos Citotóxicos de Novos Compostos Sintéticos em Células Tumorais de Mama e Próstata

Tayla Hiroki Kawatoko

Analú Rocha Costa, João Victor Silva-Silva

Adriano Defini Andricopulo

Universidade de São Paulo

tayla@usp.br

Objetivos

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos de compostos sintéticos derivados de tiazol em linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e de próstata (DU-145) assim como em células hepáticas (HepG2) e fibroblastos (HFF-1).

Métodos e Procedimentos

Neste projeto, foram testados novos compostos da classe dos tiazóis, previamente sintetizados pelo Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, nas linhagens tumorais MDA-MB-231, MCF-7 e DU-145. As soluções-estoque foram preparadas em DMSO e usadas nas concentrações indicadas para os ensaios, com um máximo de 1% de DMSO. Primeiro, foram feitos testes *in vitro* para verificar a citotoxicidade dos compostos nas linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231), de próstata (DU-145), de fígado (HepG2) e em fibroblastos não tumorais (HFF-1), buscando determinar a seletividade. Os valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50% da atividade biológica) e CC₅₀ (concentração que causa a perda de viabilidade ou sobrevivência de 50% de células saudáveis) dos compostos foi determinada

utilizando o software GraphPad 8. A partir dos resultados, foram selecionados os compostos mais promissores para investigar seu mecanismo de ação. Então, foi avaliado se os compostos afetam a polimerização da tubulina. Foram utilizados kits da Cytoskeleton (Denver, CO, USA, código BK011P) para esses testes, foram adicionados diferentes concentrações de composto solubilizado em 10% de DMSO e mistura reacional, e analisado o processo de polimerização em um fluorímetro pré-aquecido a 37°C e em comprimentos de onda de excitação em de 340 e emissão em 460 nm. Por fim, foi feita uma avaliação das propriedades farmacocinéticas dos compostos utilizando o servidor web SwissADME.

Resultados

A fim de determinar os compostos com melhor seletividade, baixa hepatotoxicidade e com potencial para serem utilizados como agentes quimioterápicos, foi realizada uma triagem inicial com 11 compostos nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7, DU-145, HFF-1 e HepG2 apresentados na Tabela 1. A nível de comparação, a citotoxicidade dos fármacos de referência doxorrubicina e colchicina foram avaliadas, uma vez que esses compostos são conhecidos na literatura por sua atividade

anticâncer. Apenas os compostos 2, 8, 9 e 10 apresentaram alta seletividade (IS > 10).

Tabela 1. Atividade antiproliferativa dos compostos 2, 8, 9 e 10 diante das linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-7, HFF-1 e HepG2.

Compostos	IC ₅₀ (µM)		CC ₅₀ (µM)		IS	
	MDA-MB-231	MCF-7	HFF-1	HepG-2	MDA-MB-231	MCF-7
2	37,89 ± 0,59	2,88 ± 0,05	> 64	> 64	1,70	22,25
8	37,50 ± 0,19	4,13 ± 0,11	> 64	> 64	1,71	15,51
9	15,82 ± 0,36	3,82 ± 1,17	> 64	> 64	4,05	16,74
10	10,89 ± 5,83	4,70 ± 0,68	> 64	> 64	5,87	13,63
Doxorrubicina	0,397 ± 0,115	0,13 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,52	1,62
Colchicina	0,030 ± 0,005	1,16 ± 0,61	0,12 ± 0,07	0,38 ± 0,08	4,0	0,33

IC₅₀ - Concentração inibitória de 50%; CC₅₀ - Concentração citotóxica de 50%; IS - Índice de seletividade. Os valores de IC₅₀ (µM) são a média ± DP de dois experimentos individuais.

De acordo com a literatura, os compostos tiazóis têm atividade como inibidores de polimerização da tubulina. Dessa forma, foi feita a avaliação da modulação da tubulina com os compostos mais ativos da triagem de citotoxicidade inicial. Na Figura 1 observa-se que os compostos mais ativos possuem comportamento semelhante a colchicina, um desestabilizador de microtúbulos.

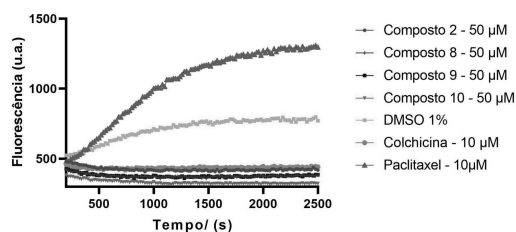


Figura 1. Ensaio de polimerização da tubulina com os compostos 2, 8, 9, 10, os controles paclitaxel e colchicina e DMSO.

A análise *in silico* foi realizada por meio da plataforma SwissADME. Os compostos mais ativos foram avaliados e nenhum deles violou a Regra dos 5 de Lipinski (indicativo de boa biodisponibilidade oral), além de demonstrarem alta absorção intestinal e ausência de permeabilidade à barreira hematoencefálica, características que reforçam um potencial para o desenvolvimento farmacológico.

Conclusões

A investigação identificou os compostos 2, 8, 9 e 10 como candidatos favoráveis para o tratamento do câncer de mama triplo positivo, devido à seletividade na inibição da viabilidade celular da linhagem MCF-7, e sem toxicidade para células saudáveis (HFF-1). Ensaio de polimerização da tubulina sugerem que esses compostos atuam como desestabilizadores de microtúbulos, com mecanismo semelhante ao da colchicina, um conhecido desestabilizador de microtúbulos. Entretanto, não é possível afirmar que os compostos são desestabilizadores de microtúbulos. Além disso, apresentaram perfil físico-químico favorável, atendendo à Regra de Lipinski, com boa absorção gastrointestinal e ausência de permeabilidade à barreira hematoencefálica, indicando potencial para desenvolvimento farmacológico.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Autores Analu Rocha Costa e João Victor Silva-Silva planejaram o estudo e realizaram a revisão final do manuscrito. Autora Tayla Hiroki Kawatoko realizou a coleta, análise dos dados e redação do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Referências

- [1] MOLANI GOL, Roghayeh; KHEIROURI, Sorayya. The effects of quercetin on the apoptosis of human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231: A systematic review. *Nutrition and Cancer*, v. 74, n. 2, p. 405-422,
- [2] WANG, Guangcheng et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazole-naphthalene derivatives as potential anticancer agents and tubulin polymerisation inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, v. 36, n. 1, p. 1693-1701, 2021.
- [3] DUMONTET, Charles; JORDAN, Mary Ann. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*, v. 9, n. 10, p. 790-803, 2010.

Investigation of the Cytotoxic Effects of New Synthetic Compounds on Breast and Prostate Tumor Cells

Tayla Hiroki Kawatoko

Analú Rocha Costa, João Victor Silva-Silva

Adriano Defini Andricopulo

University of São Paulo

tayla@usp.br

Objectives

The present study aimed to evaluate the cytotoxic effects of synthetic thiazole-derived compounds on breast cancer (MDA-MB-231 and MCF-7) and prostate cancer (DU-145) cell lines, as well as on liver cells (HepG2) and fibroblasts (HFF-1).

Methods and Procedures

In this project, new compounds of the thiazole class, previously synthesized by Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, were tested on the MDA-MB-231, MCF-7, and DU-145 tumor cell lines. Stock solutions were prepared in DMSO and used at the indicated concentrations for the assays, with a maximum of 1% DMSO. First, *in vitro* tests were performed to verify the cytotoxicity of the compounds in breast cancer (MDA-MB-231), prostate cancer (DU-145), liver (HepG2) cell lines, and non-tumor fibroblasts (HFF-1), to determine selectivity. The IC₅₀ (concentration that inhibits 50% of biological activity) and CC₅₀ (concentration that causes 50% loss of viability or survival of healthy cells) values of the compounds were determined using GraphPad 8 software. The selectivity index (SI) was calculated using the ratio of the

CC₅₀ value (non-tumor cell line) / IC₅₀ (tumor cell line). From the results, the most promising compounds were selected to investigate their mechanism of action. Then, it was evaluated whether the compounds affect the polymerization of tubulin, a protein essential for cell division. Kits from Cytoskeleton (Denver, CO, USA, code BK011P) were used for these tests. Different concentrations of the compound solubilized in 10% DMSO and a reaction mixture (2 mg/ml tubulin; 80 mM PIPES; 0.5 mM EGTA; 1 mM GTP; 2 mM MgCl₂, 15% glycerol, and 10 μM DAPI; at pH 6.9) were added, and the polymerization process was analyzed in a fluorometer preheated to 37°C at excitation and emission wavelengths of 340 nm and 460 nm, respectively. Finally, an evaluation of the pharmacokinetic properties of the compounds was performed using the SwissADME web server.

Results

To determine the compounds with the best selectivity, low hepatotoxicity, and potential for use as chemotherapeutic agents, an initial screening of 11 compounds was performed on the MDA-MB-231, MCF-7, DU-145, HFF-1, and HepG2 cell lines, as presented in Table 1. For comparison, the cytotoxicity of the reference

drugs doxorubicin and colchicine was evaluated, since these compounds are known in the literature for their anticancer activity. Only compounds 2, 8, 9, and 10 showed high selectivity (SI > 10).

Table 1. Antiproliferative activity of compounds 2, 8, 9, and 10 against the MDA-MB-231, MCF-7, HFF-1, and HepG2 cell lines.

Compounds	IC ₅₀ (μM)		CC ₅₀ (μM)		SI	
	MDA-MB-231	MCF-7	HFF-1	HepG-2	MDA-MB-231	MCF-7
2	37.69 ± 0.59	2.88 ± 0.05	> 64	> 64	1.70	22.26
8	37.50 ± 0.19	4.13 ± 0.11	> 64	> 64	1.71	15.51
9	15.82 ± 0.36	3.82 ± 1.17	> 64	> 64	4.05	16.74
10	10.89 ± 5.83	4.70 ± 0.68	> 64	> 64	5.87	13.63
Doxorubicin	0.397 ± 0.115	0.13 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.52	1.82
Colchicine	0.030 ± 0.005	1.16 ± 0.61	0.12 ± 0.07	0.38 ± 0.08	4.0	0.33

IC₅₀ - 50% inhibitory concentration; CC₅₀ - 50% cytotoxic concentration; SI - Selectivity Index. The IC₅₀ (μM) values are the mean ± SD of two individual experiments.

According to the literature, thiazole compounds have activity as tubulin polymerization inhibitors. Therefore, the modulation of tubulin was evaluated with the most active compounds from the initial cytotoxicity screening. In Figure 1, it is observed that the most active compounds have a behavior similar to colchicine, a microtubule destabilizer.

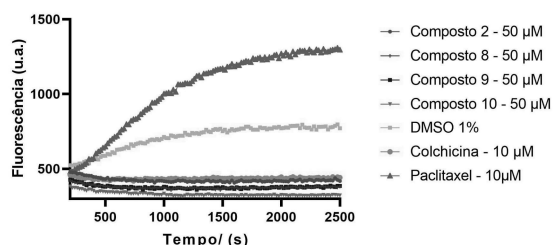


Figure 1. Tubulin polymerization assay with compounds 2, 8, 9, 10, the controls paclitaxel and colchicine, and DMSO.

The *in silico* analysis was performed using the SwissADME platform. The most active compounds were evaluated and none of them violated Lipinski's Rule of 5 (indicative of good oral bioavailability), in addition to demonstrating high intestinal absorption and no permeability to the blood-brain barrier, characteristics that reinforce a potential for pharmacological development.

Conclusions

The investigation identified compounds 2, 8, 9, and 10 as favorable candidates for the treatment of triple-positive breast cancer, due to the selectivity in inhibiting the cell viability of the MCF-7 lineage, and without toxicity to healthy cells (HFF-1). Tubulin polymerization assays suggest that these compounds act as microtubule destabilizers, with a mechanism similar to that of colchicine, a known microtubule destabilizer. Furthermore, they presented a favorable physicochemical profile, complying with Lipinski's Rule, with good gastrointestinal absorption and no permeability to the blood-brain barrier, indicating potential for pharmacological development.

The authors declare no conflict of interest.

Authors Analu Rocha Costa and João Victor Silva-Silva planned the study and performed the final review of the manuscript. Author Tayla Hiroki Kawatoko performed the data collection, analysis, and writing of the manuscript. All authors approved the final version of the abstract.

References

- [1] MOLANI GOL, Roghayeh; KHEIROURI, Sorayya. The effects of quercetin on the apoptosis of human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231: A systematic review. *Nutrition and Cancer*, v. 74, n. 2, p. 405-422, 2022.
- [2] FOULKES, William D.; SMITH, Ian E.; REIS-FILHO, Jorge S. Triple-negative breast cancer. *New England journal of medicine*, v. 363, n. 20, p. 1938-1948, 2010.
- [3] WANG, Guangcheng et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazole-naphthalene derivatives as potential anticancer agents and tubulin polymerisation inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, v. 36, n. 1, p. 1693-1701, 2021.
- [4] DUMONTET, Charles; JORDAN, Mary Ann. Microtubule-binding agents: a dynamic field of



cancer therapeutics. Nature reviews Drug discovery, v. 9, n. 10, p. 790-803, 2010.

[5] PEERZADA, Mudasir Nabi; DAR, Mohammad Sultan; VERMA, Saurabh. Development of tubulin polymerization inhibitors as anticancer agents. Expert opinion on therapeutic patents, v. 33, n. 11, p. 797-820, 2023.