

Título em Português: Lactonas Ativas em Linhagem Tumoral Metastática de Mama

Título em Inglês: Lactonas Ativas em Linhagem Tumoral Metastática de Mama

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: Biofísica Molecular

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

LACTONAS ATIVAS EM LINHAGEM TUMORAL METASTÁTICA DE MAMA

Larissa Daniela Dias Rafael

Matheus da Silva Souza, Thiago Sabino da Silva

Adriano Defini Andricopulo

Universidade de São Paulo

larissaddias.rafael@usp.br

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo a identificação e caracterização de novos compostos bioativos conhecidos como lactonas, candidatos à terapia para o tratamento do TNBC. O *screening* dos compostos se deu por meio de ensaios de citotoxicidade, seletividade, migração e 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

O câncer é considerado um problema de saúde pública, com diversos subtipos, como é o caso do câncer de mama, que apresenta dezenove subdivisões principais. Entre elas, destaca-se o câncer de mama triplo-negativo (TNBC, *triple-negative breast cancer*), que é uma das formas mais agressivas da doença. O TNBC é caracterizado pela ausência dos receptores de progesterona e estrogênio, além da amplificação do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), o que contribui para prognósticos desfavoráveis, tardios e altas taxas de metástase cerebral e pulmonar. Nas últimas décadas, houve avanços promissores no tratamento do TNBC, embora ainda existam desafios significativos. (1-3) Uma

área de grande interesse é a utilização de produtos naturais em estratégias terapêuticas combinadas, como as lactonas. Neste projeto, foi realizada uma triagem biológica inicial de compostos bioativos conhecidos como lactonas, planejados para atuarem na proteína tubulina, que é o alvo molecular do estudo, influenciando sua capacidade de polimerização e inibindo seletivamente a proliferação de células TNBC da linhagem MDA-MB-231. Para isso, três compostos sintéticos de lactonas foram selecionados com base em ensaios prévios de citotoxicidade *in vitro*, com índice de seletividade (IS) superior a 5 (MDA-MB-231 em comparação com fibroblastos humanos saudáveis, HFF-1). A potência biológica dos compostos em relação à inibição da migração e invasão celular foi avaliada por meio de ensaios quantitativos em câmara de Boyden. A modulação da tubulina pelos compostos foi avaliada por meio de um ensaio de polimerização *in vitro* da proteína, utilizando o composto fluorescente DAPI, que se liga preferencialmente aos microtúbulos em vez dos dímeros livres de tubulina.

Resultados

Três compostos de lactonas foram selecionados por serem ativos em MDA-MB-231 e seletivos contra fibroblastos humanos não tumorais (HFF-1). Tais moléculas também mostraram atividade antimigratória em ensaios qualitativos, motivado por esta triagem preliminar. Os resultados mostraram que os compostos pré-selecionados

também foram capazes de incapacitar seletivamente a linhagem MDA-MB-231 contra fibroblastos com SI > 5 (**Tabela 1**). Para tanto, os compostos procederam a ensaios bioquímicos com a proteína alvo.

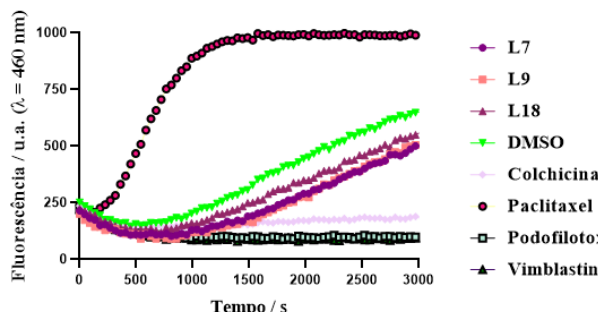
Tabela 1 – Valores de IC₅₀ (µM) dos compostos nos ensaios de migração celular.

COMPOSTO	Linhagem Metastática de Mama
	MDA-MB-231 (IC ₅₀ / µM) MIGRAÇÃO
L7	5,07 ± 0,09
L9	4,30 ± 0,49
L18	6,98 ± 0,65
COLCHICINA	0,40 ± 0,04

Fonte: elaborada pela autora.

Ensaio de modulação *in vitro* permitiram a identificação de perfis característicos associados à atividade de agentes desestabilizadores e estabilizadores de microtúbulos para determinados controles (**Figura 1**). A triagem de concentração única permitiu caracterizar os compostos como inibidores da polimerização da tubulina.

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



Fonte: elaborada pela autora.

A determinação de IC₅₀ para os compostos ativos **1–3 (Tabela 2)** mostrou que a substituição do metóxibenzeno (**1**) (IC₅₀ = 0,92 µM) por dimetóxibenzeno (**2**) (IC₅₀ = 0,96 µM) é tolerável, não levando à alteração da atividade biológica. Em contrapartida, a substituição por um bromobenzeno (**3**) (IC₅₀ = 3,17 µM) levou à redução da potência em cerca de 3 vezes quando comparado aos compostos **1** e **2**.

Tabela 2. IC₅₀ dos controles e compostos no ensaio de polimerização da tubulina.

COMPOSTO	POLIMERIZAÇÃO DA TUBULINA IC ₅₀ C ₅₀ ^a ± DP/ µM
L7	21,84 ± 0,42
L9	9,36 ± 0,21
L18	31,43 ± 2,59
COLCHICINA	0,99 ± 0,03
PACLITAXEL	1,87 ± 0,10 ^a
PODOFILOTOXINA	0,36 ± 0,01
VIMBLASTINA	0,17 ± 0,01

^aPotência de promoção da polimerização.

Fonte: elaborada pela autora.

Conclusões

O *screening* dos compostos da classe de lactonas determinou os compostos L7, L9 e L18 como promissores em linhagem metastática tumoral de mama (MDA-MB-231). A avaliação destes compostos, forneceu informações importantes sobre os padrões estruturais

relevantes para a inibição de características fundamentais associadas à disseminação do câncer.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade de São Paulo e ao Instituto de Física de São Carlos pela oportunidade de realizar a pesquisa. Agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro. Agradeço também ao Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC).

Referências

- 1 BIANCHINI, G. *et al.* Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 11, p. 674–690, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>.
- 2 GUO, B. *et al.* Co-delivery of gemcitabine and paclitaxel plus NanoCpG empowers chemoimmunotherapy of postoperative “cold” triple-negative breast cancer. **Bioactive Materials**, v. 25, p. 61–72, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.01.014>.
- 3 KALEEM, M. *et al.* Epigenetics of triple-negative breast cancer via natural compounds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1436–1458, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867328666210707165530>.

ACTIVE LACTONES IN METASTATIC BREAST TUMOR LINE

Larissa Daniela Dias Rafael

Matheus da Silva Souza, Thiago Sabino da Silva

Adriano Defini Andricopulo

Universidade de São Paulo

larissaddias.rafael@usp.br

Objectives

The present work aims to identify and characterize new bioactive compounds known as lactones, candidates for therapy for the treatment of TNBC. The compounds were screened through cytotoxicity, selectivity, migration and investigation of the modulation activity of the best molecules in relation to the tubulin protein through in vitro polymerization and competition tests for the colchicine site.

Materials and Methods

Cancer is considered a public health problem, with several subtypes, such as breast cancer, which has nineteen main subdivisions. Among them, triple-negative breast cancer (TNBC) stands out, which is one of the most aggressive forms of the disease. TNBC is characterized by the absence of progesterone and estrogen receptors, in addition to amplification of the human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), which contributes to unfavorable, late prognosis and high rates of brain and lung metastasis. In recent decades, there have been promising advances in the treatment of TNBC, although significant challenges remain. (1-3) One area of great interest is the use of natural products in combined therapeutic strategies, such as lactones. In this project, an initial biological screening of bioactive compounds known as lactones, planned to act on the tubulin protein, which is the molecular target of the

study, was carried out, influencing its polymerization capacity and selectively inhibiting the proliferation of TNBC cells of the MDA-MB-231. For this, three synthetic lactone compounds were selected based on previous in vitro cytotoxicity assays, with a selectivity index (SI) greater than 5 (MDA-MB-231 compared to healthy human fibroblasts, HFF-1). The biological potency of the compounds in relation to the inhibition of cell migration and invasion was evaluated using quantitative assays in a Boyden chamber. The modulation of tubulin by the compounds was evaluated by means of an in vitro protein polymerization assay, using the fluorescent compound DAPI, which binds preferentially to microtubules instead of free tubulin dimers.

Results

Three lactone compounds were selected because they were active on MDA-MB-231 and selective against human non-tumor fibroblasts (HFF-1). Such molecules also showed antimigratory activity in qualitative assays, motivated by this preliminary screening. The results showed that the preselected compounds were also able to selectively disable the MDA-MB-231 strain against fibroblasts with SI > 5 (Table 1). For this purpose, the compounds underwent biochemical assays with the target protein.

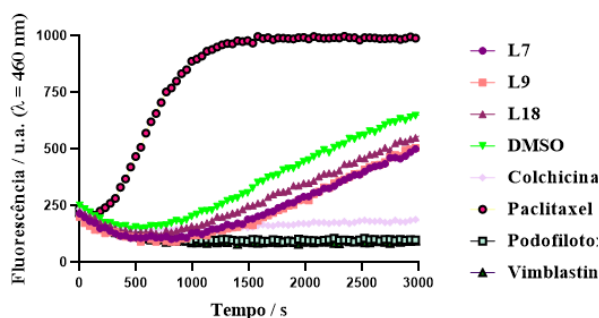
Table 1 – IC₅₀ (μM) values of compounds in cell migration assays.

COMPOUND	Metastatic Lineage from breast
	MDA-MB-231 (IC ₅₀ / μM) MIGRATION
L7	5,07 ± 0,09
L9	4,30 ± 0,49
L18	6,98 ± 0,65
COLCHICINE	0,40 ± 0,04

Source: prepared by the author.

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

Figure 1. Tubulin protein modulation profiles in in vitro polymerization assays.



Source: prepared by the author.

IC₅₀ determination for active compounds **1–3** (**Table 2**) showed that the replacement of methoxybenzene (**1**) (IC₅₀ = 0.92 μM) by dimethoxybenzene (**2**) (IC₅₀ = 0.96 μM) is tolerable, not leading to the alteration of the biological activity. On the other hand, substitution by a bromobenzene (**3**) (IC₅₀ = 3.17

μM) led to a reduction in potency by about 3 times when compared to compounds **1** and **2**.

Table 2. IC₅₀ of controls and compounds in the tubulin polymerization assay.

COMPOUND	POLYMERIZATION TUBULIN IC ₅₀ C ₅₀ ^a ± DP/ μM
L7	21,84 ± 0,42
L9	9,36 ± 0,21
L18	31,43 ± 2,59
COLCHICINE	0,99 ± 0,03
PACLITAXEL	1,87 ± 0,10 ^a
PODOPHILLOTOXIN	0,36 ± 0,01
VIMBLASTINE	0,17 ± 0,01

^aPower to promote polymerization.

Source: prepared by the author.

Conclusions

The screening of compounds from the lactone class determined compounds L7, L9 and L18 as promising in breast tumor metastatic lineage (MDA-MB-231). The evaluation of these compounds provided important information about structural patterns relevant to the inhibition of key features associated with cancer spread.

Acknowledgements

I thank the University of São Paulo and the Institute of Physics of São Carlos for the opportunity to carry out the research. Thanks to CNPq for the financial support. I would also like to thank the Laboratory of Medicinal and Computational Chemistry (LQMC).

References

- 1 BIANCHINI, G. *et al.* Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 11, p. 674–690, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>.
- 2 GUO, B. *et al.* Co-delivery of gemcitabine and paclitaxel plus NanoCpG empowers chemoimmunotherapy of postoperative “cold” triple-negative breast cancer. **Bioactive Materials**, v. 25, p. 61–72, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.01.014>.
- 3 KALEEM, M. *et al.* Epigenetics of triple-negative breast cancer via natural compounds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1436–1458, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867328666210707165530>.