

Avaliação da ação biológica *in vitro* de compostos derivados de benzaldeído limoneno tiossemicarbazonas em células de melanoma humano (SK-MEL-37).

Débora Cristina Silva dos PASSOS, Lídia Andreu GUILLO, Cecília Maria Alves de OLIVEIRA, Elizângela RIBEIRO.

Instituto de Ciências Biológicas (ICB-II)

Crissilva03@gmail.com

Palavras-chave: Benzaldeído limoneno tiossemicarbazonas, melanoma, MTT, apoptose.

INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo pode ser definido como um tumor maligno devido à transformação atípica dos melanócitos (SLOMINSKI *et. al.*, 2004), o melanoma metastático apresenta alta taxa de resistência em relação à quimioterapia, imunoterapia e radioterapia demonstrando pequenos níveis de apoptose espontânea *in vivo* quando comparado com outros tipos celulares, por todas essas razões são adequados os estudos para a aplicação de novos compostos que possam exercer uma ação eficaz na indução de apoptose nessas células. Os derivados das tiossemicarbazonas apresentam interesse científico, devido às inúmeras propriedades biológicas, tais como antiviral (WNUK & Robins, 2006), antitumoral e citotóxica (KARALI, 2002) além de apresentar ação eficaz contra bactérias, fungos (BERALDO, 2004) e protozoários. Diante da diversidade de utilizações das tiossemicarbazonas, o grupo de Química Orgânica Sintética do Instituto de Química da UFG, em cooperação com pesquisadores do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, sintetizaram uma série de tiossemicarbazonas derivadas do monoterpeneo natural do R-(+)-limoneno, que é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja e do óleo essencial de alcarávia.

Os compostos da série dos derivados de limoneno (TBL) ensaiadas nesse estudo foram: Benzaldeído tiossemicarbazona limoneno (LIM-04), Tiossemicarbazida limoneno (LIM-05), o-Nitro tiossemicarbazona limoneno (LIM-17), m-Nitro tiossemicarbazona limoneno (LIM-18), p-Nitro tiossemicarbazona limoneno (LIM-19), p-Dimetilamino tiossemicarbazona limoneno (LIM-23) e p-Hidróxi tiossemicarbazona limoneno (LIM-25), com a finalidade de verificar a ação biológica *in vitro* de compostos derivados de benzaldeído limoneno tiossemicarbazona (TBL) em células de melanoma humano (SK-MEL-37).

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem celular e manutenção:

A linhagem de melanoma humano SKMEL-37 foi doada pelo Dr, Loyd J. Old do Instituto de Câncer Memorial Sloan-Kettering, New York, USA. As células foram mantidas em meio MEM contendo 10% de soro fetal bovino em frascos de 25cm² a 37°C em incubadora com 5% de CO₂.

Avaliação da atividade antiproliferativa ou citotóxica

As células foram tratadas com uma concentração constante de 100 µM de cada composto. Após 24, 48 ou 72 horas de observação fez-se uma seleção visual e a partir dela, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular através do ensaio de MTT onde a atividade celular é quantificada pela redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (CARMICHEL, 1987). Para a construção dos gráficos e cálculo do IC₅₀ (Concentração Inibitória para 50% das células), utilizou-se o Programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows, da GraphPad Software, San Diego, USA, www.graphpad.com.

Avaliação da morte celular por citometria de fluxo

As células foram semeadas em placas de petri de 10cm² de diâmetro. Ao final de 24 horas de crescimento, as placas foram tratadas com TBL e Doxo, na concentração única de 100µM. Ao final de 48h de tratamento, as células foram desprendidas da placa, fixadas com etanol 70% e marcadas com solução de iodeto de propídeo (PI). 10000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo (FACScan Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) usando a 488 nm. Os dados foram analisados usando os software CellQuest™ e o programa WinMDI.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A figura 1 mostra os sete compostos derivados de benzaldeído limoneno tiossecarbazonas estudados após 72h de incubação com uma concentração de 100 µM.

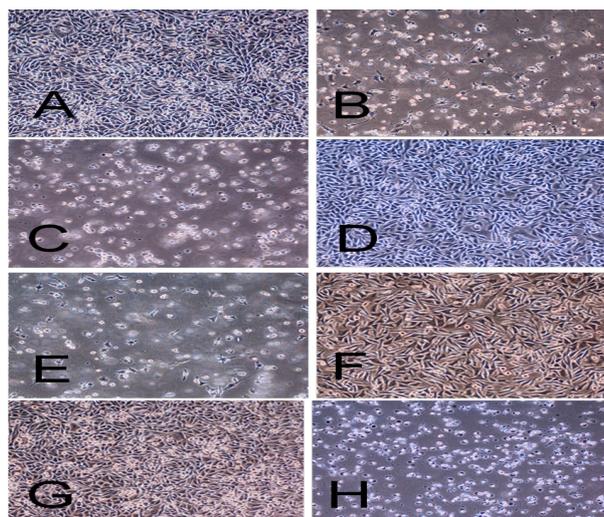


Figure 1: Painel do aspecto visual da cultura de células de melanoma SK-Mel-37 após 48 horas de tratamento com uma concentração de 100 µM dos diversos TBL: (A) Controle:DMSO/etanol; (B) LIM-04, (C) LIM-05, (D) LIM-17, (E) LIM-18, (F) LIM-19, (G) LIM-23 e (H) Lim-25. As células foram observadas e fotografadas com microscópio óptico invertido no próprio frasco de cultivo. Ampliação 100x.

Determinação da concentração inibitória (IC₅₀)

A figura 2 mostra os resultados obtidos nos ensaios de MTT.

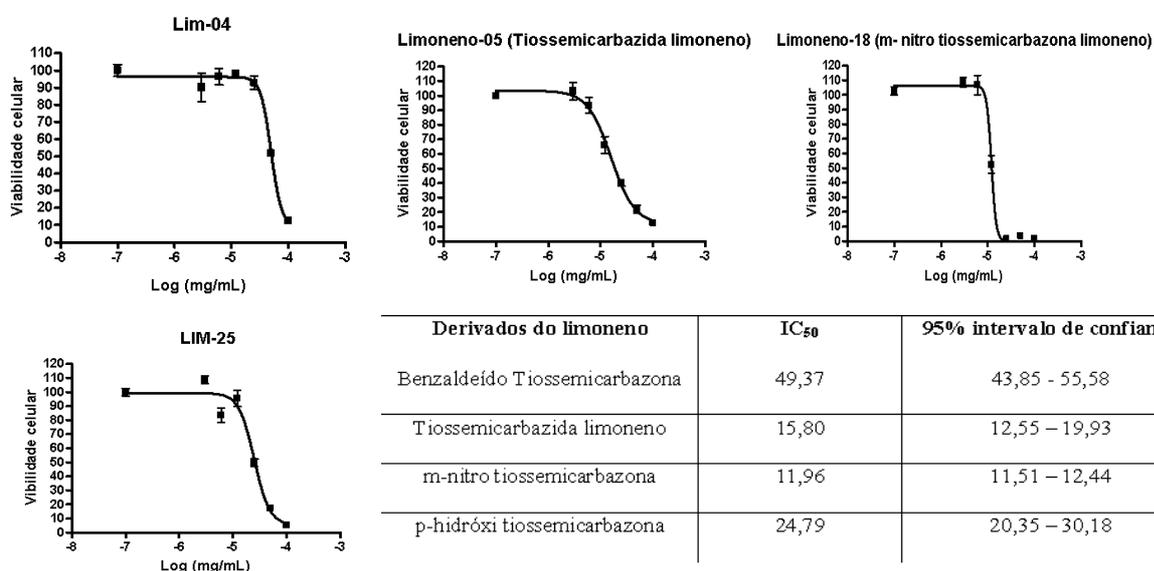


Figura 2: Gráficos dose-resposta do tratamento das células de melanoma humano SK-Mel-37 por 72 horas, com diferentes concentrações dos compostos pré-selecionados. O valor do IC₅₀ apresentado foi obtido com o programa GraphPad Prism. A figura mostra ainda, o quadro com os valores de IC₅₀ e intervalos de confiança dos TBL frente ao MTT.

Os resultados apresentados pelo LIM-05 e o LIM-18 podem ser comparados aos observados para outras tiossemicarbazonas mencionadas na literatura. Compostos de 4-N-fenil-2-benzoilpiridina tiossecarbazona complexados com estanho (Sn (IV)), mostraram-se muito eficientes em testes de citotoxicidade em células de câncer de mama (MCF-7) e carcinoma renal (TK-10) humano, apresentando valores de IC₅₀ entre < 0,002 μM e 17,3 μM , respectivamente. Em células de melanoma humano (UACC-62) esses derivados apresentaram valores de IC₅₀ em torno de 9,7 μM, (REBODELLO et al., 2005).

Ferrari et al. (2003) apresentou experimentos de derivados de piridoxal tiossemicarbazonas testados em células de leucemia humana (U937, CEM, e K562). Que apresentaram valores de IC₅₀ semelhantes aos Lim-04 e LIM-25.

Neste estudo, observou-se que após 48h de tratamento, a porcentagem de células na fase subG0 (apoptóticas), variou entre 14,39% e 29,95%, dependendo do composto estudado, sendo que as células não tratadas apresentavam apenas 7,05% das células nessa fase. Paralelamente, observou-se um aumento na porcentagem das células na fase SG2M, indicando que o efeito inibitório no crescimento das células de melanoma, pode ser devido à parada provocada na fase SG2/M do ciclo celular. Os resultados (Figura 3) sugerem que esses compostos exibem efeitos antiproliferativos via indução de apoptose. Sabe-se que o sucesso de agentes quimioterapêuticos estaria vinculado à potencialidade em induzir apoptose em células malignas (Syng-ai *et al.*, 2004). Assim, compostos que previnem a progressão das células no ciclo celular, e induzem apoptose, como o TBL, podem ser usados como reguladores negativos da proliferação celular no tratamento do câncer, inclusive do melanoma (Chen & Huang, 1998).

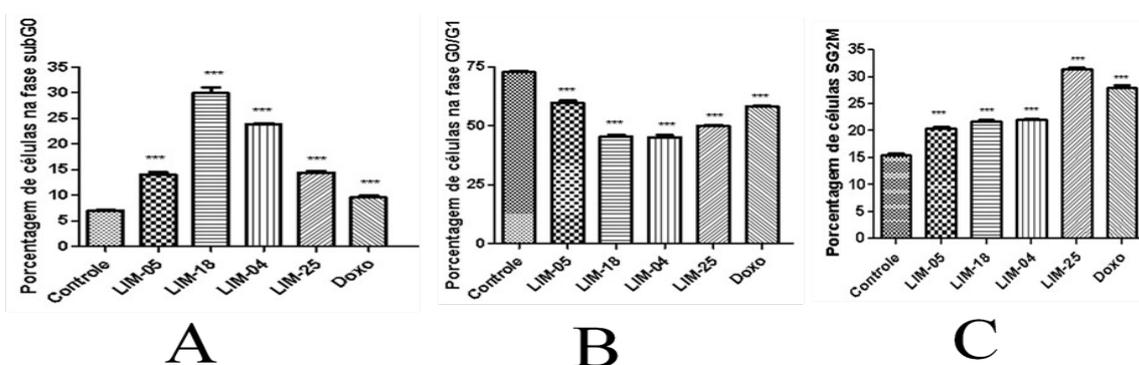


Figura 3: Células SK-MEL-37 cells (3×10^5 cells/mL) tratadas com TBL com uma concentração de 100 μ M durante 48 h. Os dados foram analisados por ANOVA and Bonferroni's post test ($p < 0.001$).

Conclusão

Os resultados sugerem que TBL exibem efeitos antiproliferativos via indução de apoptose. Além disso, apresentam um baixo valor de IC50, podendo ser candidatos atraentes para ensaios pré-clínicos *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERALDO, H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico Usos Clínicos, *Quimica. Nova* **2004**, 27, 461.
- CARMICHEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B.; Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Cancer Res.* **1987**, 47, 936.
- CHEN, H-W. & HUANG, H-C. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, **1998**. 124, 1029-1040.
- FERRARI, M. B.; BISCEGLIE, F.; PELOS, G.; SASSI, M.; TARASCONI, P.; CORNIA, M.; CAPACCHI, S.; ALBERTINI, R.; PINELLIS, S. Synthesis, characterization and X-ray structures of new antiproliferative and proapoptotic natural aldehyde thiosemicarbazones and their nickel (II) and copper (II) complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2002**. 90 - 113.
- KARALI, N. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 909.
- SYNG-AI, C. KUMARI, A. L., KHAR, A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: Role of glutathione and bcl-2. *Mol Cancer Ther*, **2004**. 3, n. 9, 1101-1108.
- SLOMINSKI, A.; TOBIN, D.J.; SHIBAHARA, S. & WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol rev.* **2004**, 84(4), 1155-1228.
- TEITZ, Y.; RONEN, D.; VANSOVER, A.; STEMATSKY, T.; RIGGS, J. L. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin-beta 4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin-beta-4':4'-diallylthiosemicarbazone. *Antiviral Res.* **1994**, 24, 305.
- WNUK, S.F., ROBINS, M.J. Ribonucleotide reductase inhibitors as anti-herpes agents. *Antiviral Res.* **2006**, 71, 122.