



ATIVIDADE CITOTÓXICA SINÉRGICA DE DISSULFIRAM E COBRE FRENTE AO MELANOMA E HEPATOCARCINOMA

Marissa Bolson Serafin^{1*}; Vitória Segabinazzi Foletto¹; Taciéli Fagundes Da Rosa¹; Altevir
Rossato Viana²; Laísa Nunes Franco³; Rosmari Hörner^{1,4}

¹Laboratório de Bacteriologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Santa Maria

²Laboratório de Nanociências, Universidade Franciscana

³Laboratório de Bacteriologia, Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria

⁴Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria

*e-mail: marissabolson @gmail.com

Os índices de desenvolvimento do câncer continuam crescendo mundialmente. O melanoma e o hepatocarcinoma, possuem uma etiologia heterogênea e complexa, e as melhores respostas ao tratamento baseiam-se na quimioterapia citotóxica, limitada por fatores como imunossupressão, resistência e toxicidade, restringindo os avanços terapêuticos. Assim o reposicionamento de medicamentos tem ganhado destaque nas pesquisas. Esse termo é definido como a utilização de medicamentos já aprovados e bem estabelecidos na clínica, para o tratamento de doenças diferentes da sua indicação original. Possui vantagens em relação a busca tradicional de substâncias ativas, como administração mais segura, pois seus dados farmacológicos e toxicológicos já estão disponíveis, além de custo menor em relação ao seu desenvolvimento. O dissulfiram, utilizado há anos no tratamento do alcoolismo crônico, já demonstrou efeitos antineoplásicos promissores frente a uma ampla variedade de cânceres, sendo considerado um forte candidato ao reposicionamento no tratamento oncológico, tendo atividade cobre dependente descrita. O objetivo desse estudo foi analisar a atividade citotóxica *in vitro* de dissulfiram (DSF) e sua associação ao cobre, frente a linhagens celulares tumorais de melanoma (B16F10), hepatocarcinoma (HepG2) e linhagem não tumoral de macrófagos (Raw 264.7). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Aproximadamente 10.000 células foram adicionadas às microplacas de 96 orifícios de fundo chato. As linhagens celulares foram incubadas por 24 horas, a 5% de CO₂ em atmosfera umidificada para aderência suficiente das células às placas. A seguir, as mesmas foram incubadas nas condições descritas anteriormente, com sete diferentes concentrações (1µM; 3µM; 6µM; 12µM; 25µM; 50µM; 100µM) do dissulfiram ou do cloreto de cobre (II) e ainda com a combinação dessas concentrações de dissulfiram com 3µM de cloreto de cobre (II), a fim de investigar suas interações. Após a incubação, 20µL de MTT (5mg/mL) foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas por mais 4 horas. A seguir, o meio foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos pela adição de 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A citotoxicidade foi detectada por meio da medida das absorbâncias a 570 nm em leitora de microplacas (Anthos-2010). Os experimentos foram todos realizados em triplicata e a viabilidade celular para cada concentração dos compostos foi expressa em porcentagem, comparada com a obtida para os controles não tratados (100% de viabilidade). Os valores de

IC₅₀ (concentração do composto teste que reduziu a viabilidade celular em 50%) foram estimados por análise de regressão não linear. Para fins de controle e comparação, foram avaliadas as atividades dos medicamentos antineoplásicos utilizados na terapia clínica, temozolomida e sorafenibe. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey, usando o software *Graph Pad Prism 5* (Graph Pad, San Diego, CA). Diferenças com $p < 0,05^*$ foram consideradas significativas. Após, foi determinado o Índice de Combinação (CI) da associação (DUAN et al., 2014), com a seguinte interpretação: CI = 1 indica aditividade; CI < 1 sinergismo e CI > 1 indica antagonismo. Dissulfiram apresentou IC₅₀ = 9,14 no hepatocarcinoma, IC₅₀ = 29,36 no melanoma e IC₅₀ = 17,5 nos macrófagos. Nas mesmas linhagens, cloreto de cobre (II) apresentou IC₅₀ = 25,88; IC₅₀ = 22,46 e IC₅₀ = 8,41, respectivamente. A combinação das duas substâncias apresentou IC₅₀ de 5,42 na linhagem de hepatocarcinoma, valor menor que o apresentado pelo medicamento padrão sorafenibe (IC₅₀ = 7,13), sendo considerada sinérgica a associação de DFS e cobre (CI < 1). Frente ao melanoma, a combinação apresentou IC₅₀ = 8,25; valor próximo ao obtido para temozolomida, sendo também considerada sinérgica a combinação (CI < 1). Frente as células não tumorais, associadas, as substâncias apresentaram IC₅₀ = 17,42; devido a esse valor, a combinação foi considerada antagônica. Com base nos resultados apresentados, pode-se inferir dissulfiram como um potencial candidato ao reposicionamento de medicamentos no tratamento do câncer, principalmente no que diz respeito à sua utilização em combinação ao cobre, uma vez que apresenta efeito sinérgico frente as linhagens tumorais de melanoma e hepatocarcinoma. Ainda não havia sido relatada sua atividade frente a essas linhagens celulares tumorais, destacando a importância do segmento de pesquisas que visem a procura pelas atividades citotóxicas desse medicamento.

Agradecimentos: Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

Palavras-chave: Reposicionamento de medicamentos; Dissulfiram; Câncer; Sinergismo de drogas; Citotoxicidade.