



## **Efeito do Polioxovanadato $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$ sobre a Citotoxicidade e Morfologia Celular em Linhagem B16F10**

Ana Beatriz lung<sup>1</sup>, Rafael Benedetti<sup>2</sup>, Gabriel Tavares<sup>3</sup>, Yasmine M. Pupo<sup>4</sup>, Mauricio P. Franco<sup>5</sup>, Kahoana Postal<sup>6</sup>, Giovana G. Nunes<sup>7</sup>, Jaísa F. Soares<sup>8</sup>, Daniela F. Maluf<sup>9</sup>

### **Resumo**

O melanoma é um câncer com alta incidência e de grande relevância pública. Os métodos de tratamento para o melanoma são agressivos, gerando uma preocupação na busca por novas terapias. Derivados de vanádio tem mostrado um potencial efeito citotóxico às células neoplásicas, podendo ser utilizado como agente antitumoral. Por este motivo, o foco deste trabalho é verificar a ação dos compostos de vanádio  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$  em relação às células de melanoma da linhagem B16F10. Na análise dos resultados, as células tratadas com o composto por 24 horas apresentaram uma diminuição da viabilidade celular em todas as concentrações testadas, mostrando um efeito citotóxico do oxovanadato  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$  nas células neoplásicas.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade. Vanádio. Melanoma.

### **Abstract**

Melanoma is an aggressive form of cancer whose treatments are aggressive, creating a demand for new therapies. In past few decades, vanadium compound has been showed a potential cytotoxic effect to malignant cells, as may be used with antitumor agent. For this reason, the focus of this work was to verify the action of the vanadium based polyoxometalate  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$  to the melanoma cell line B16F10. The effect observed in cells treated with the title compound for 24 hours was a decrease in cell viability of 40 to 60%, for all concentrations evaluated. This work showed a cytotoxic effect of an heterometallic vanadium compound to neoplastic cells.

**Keywords:** Cytotoxicity, Vanadium, Melanoma.

### **1 Introdução**

O melanoma é um câncer formado a partir dos melanócitos, células que migram da crista neural para toda a epiderme durante a fase embrionária, fato que tornam essas células normais até o aparecimento de irregularidades mediadas por fatores externos ou internos (WAINSTEIN, 2004).

Estas células são responsáveis pela pigmentação dos pelos e da pele, auxiliando na tonalidade cutânea. Quando se tornam células desenvolvidas, são encontradas em vários locais

1 Acadêmico(a) de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR.

2 Acadêmico(a) de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR.

3 Acadêmico(a) de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR.

4 Doutora em Dentística Restauradora. Professora Adjunta da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

5 Doutora em Dentística Restauradora. Professora Adjunta da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

6 Mestrando(a) do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

7 Doutora em Química, Professora e Pesquisadora do Departamento de Química - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

8 Doutora em Química, Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

9 Doutora em Ciências Farmacêuticas, Professora adjunta do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná e Professora adjunta do curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR



como mucosas, sistema nervoso central, matriz dos pelos e na pele, se localizando na camada basal da epiderme e derme (BOISSY et al., 1988).

A transformação de células normais em células malignas é um processo que envolve alterações genéticas, na maioria das vezes a partir de um rearranjo de interações entre genes culminando em mutações pontuais ou anomalias cromossômicas, como metilações do DNA e modificações pós-traducionais. Todas essas modificações acabam por influenciar as fases de crescimento celular, apoptose e diferenciação (LIN et al., 2007).

Os proto-oncogenes estão envolvidos no processo de controle celular, responsáveis pela exata mitose e proliferação de células normais. Já os oncogenes são proto-oncogenes ativados e influenciam no controle positivo de proliferação, gerando um fenótipo maligno. Alguns supressores de tumores já estão bastante caracterizados e descritos, sendo exemplos o p15, p16, p21 e p53 que funcionam em diferentes pontos de checagem associados a vários complexos garantindo a transição de uma fase mitótica à outra sem que haja erros (RIVOIRE, 2006).

Sabe-se, por exemplo, que a checagem na fase G1 da mitose (célula aumenta de tamanho e volume devido à síntese exacerbada de proteínas, lipídeos e carboidratos) é feita pela proteína p53, liberando fator p21 para se ligar ao DNA e inativá-lo em caso de erros de replicação (STANLEY, 2001).

O processo de oncogênese é proveniente da ausência de resposta celular quando a célula é submetida a estímulos, realizando processos independentes do que os proto-oncogenes sinalizam. A evolução dos proto-oncogenes para oncogenes, que passam a emitir sinalização positiva para proliferação exacerbada de células, tornam essas células aptas para realizarem mitoses excessivas e descontroladas, estarem suficientes à ausência ou presença dos fatores de crescimento, possuírem insensibilidade aos inibidores de crescimento, evadirem da morte programada (apoptose) e como consequência de todo o processo, essas células neoplásicas perdem sua diferenciação e podem adquirir capacidade de invadirem outros tecidos e se disseminarem à distância.

O melanoma cutâneo apresenta crescente incidência, responsável por um grande número de óbitos, sendo o câncer mais frequente no Brasil. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), foi estimado para 2016, 5670 novos casos. É um câncer que atinge com mais frequência indivíduos fototipos I e II de Fitzpatrick, que são expostos à radiação ultravioleta, observando uma maior presença em adultos entre 20 a 50 anos de idade (ZACHARIAS et al., 2009).

Segundo o INCA, a cirurgia é o tratamento mais indicado para o melanoma. Em alguns casos, dependendo do estágio em que se apresenta o tumor, a radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas como forma de tratamento. Pela dificuldade terapêutica tem se buscado cada vez mais alternativas, como por exemplo, compostos que apresentam um efeito antitumoral e que possam ser utilizados como terapias contra o câncer. Um desses compostos é o vanádio, sendo observado uma ação citotóxica em várias linhagens celulares malignas, como linhagens leucêmicas de células L1210, M07e, linfoma de células humanas B e carcinomas do ovário humano (EVANGELOU et al., 2002; MALUF et al., 2011).



Nas últimas décadas, os metais e seus complexos foram amplamente estudados e se fez a descoberta de potencial antitumoral em algumas moléculas e complexos delas como Cobalto, Ouro, Platina e vanádio (GASSER, 2011; HARTINGER, 2009).

O vanádio é um metal do grupo de transição, e amplamente distribuído no ambiente, onde somos expostos a este metal através da atmosfera, pela poeira gerada na refinação metalúrgica e pelos alimentos, como por exemplo, as oleaginosas e nozes (NRIAGU et al., 1998). Este metal tem demonstrado efeitos citotóxicos, gerando um processo de defesa contra o genoma celular alterado. Um dos mecanismos em que o vanádio possivelmente age é supressão de tumores, regulando a proliferação celular e normalizando o ciclo celular, induzindo a apoptose nas células mutagênicas. Este composto age ativando o p53, que atua como um protetor do genoma. O vanádio também age diminuindo a expressão do óxido nítrico sintase (iNOS), com isso, minimizando a desaminação de bases no DNA. Entre outras ações, como ativação de MAPKs que regulam várias atividades celulares como a diferenciação, mitose e responsáveis na transcrição do fator NF-KB relacionado a apoptose celular, como também, o composto atua elevando enzimas de conjugação, reduzindo a concentração intracelular de reativos carcinogênicos (DESOIZE et al., 2004; BISHAYEE et al., 2010).

Devido aos bons resultados demonstrados pelo vanádio em sua ação anticâncer, um dos desafios é encontrar compostos que permitam o uso seguro do elemento. Um dos problemas encontrados é a baixa absorção da maioria dos compostos no sistema gastrointestinal, requerendo altas doses. No entanto, quando os compostos são administrados em altas concentrações por períodos prolongados, acaba por produzir um efeito tóxico, principalmente em portadores de doenças arteriais coronarianas e de Diabetes Mellitus, causando perturbações gastrointestinais, com perda de peso e dores intestinais (BODEN et al., 1996; COHEN et al., 1995; GOLDFINE et al., 1995; SOMERVILLE et al., 1992)

Este trabalho pretende caracterizar a dose mais adequada do composto de vanádio ( $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$ ) em ensaios *in vitro* de viabilidade celular. A linhagem celular escolhida foi o B16F10, que são células de melanoma de linhagem contínua, extraídas de camundongos. Este composto, pertencente à classe dos oxometalatos, foi selecionado por permitir a associação do vanádio com segundo metal de transição, níquel (II). A associação do vanádio com outros metais de transição tem potencializado seu efeito citotóxico frente a linhagens celulares de câncer sem ser deletério a células normais.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Equipamentos

Chapa de aquecimento *Quimis mod 261.1*, Estufa de  $CO_2$  *Shel lab mod 5115*, Fluxo laminar *VECO Bio seg 09*, Microscópios Taimin TM 212 e *Bioval L100A*, Balança analítica *Boeco Germany*

max 210g d=0,1mg, Centrífuga MPW *high speed brushless centrifuge* MPW-350R, *Vortex Quimis* Q-220A, Micropipetas *Labmate* 20-200 µL e *Peguet* 100-1000 µL, Estufa para esterilização, secagem *Nevoni mod* 1.3, Banho-maria *Fanem mod* 100, Microscópio de fase invertido *Medilux* N.A. 0.3 e Leitora de microplaca *Biotek EL 800*.

## 2.2 Reagentes

Solução de tripsina 0,5% (*Vitrocell Embriolife/Brasil*), Solução de Cristal Violeta 0,2%, Solução de citrato de sódio 0,05 M, Tampão fosfato pH 7.4, Soro fetal bovino (*Vitrocell Embriolife/Brasil*), Solução antibiótica penicilina/estreptomicina 100 U.I./100 µg/mL (*Vitrocell Embriolife/Brasil*), Meio de cultura RPMI-1640 tamponado (*Vitrocell Embriolife/Brasil*).

## 2.3 Insumos

Garrafas de cultivo estéreis, placas de 96 e 06 poços estéreis, pipetas estéreis e câmara de Neubauer.

## 2.4 Tratamento das células B16F10 com o composto $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$

As células foram semeadas em placas de 96 poços e de 06 poços (MEV) e incubadas a 37° C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após adesão, as células de ambas as placas foram tratadas em concentrações crescentes (0,0001mM, 0,001mM, 0,01mM, 0,01mM e 0,1mM) do composto  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$  dissolvido em meio RPMI 10% SFB, além de células tratadas somente com o meio de cultura, constituindo o grupo controle. Após o tratamento as placas foram incubadas a 37° C em estufa de CO<sub>2</sub> pelo período de 24 h.

## 2.5 Análise da viabilidade celular com o composto $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$ pelo método cristal violeta

As células tiveram seu meio de tratamento aspirado após 24 horas com o composto. Para a fixação celular utilizou-se 100 µL de metanol em cada poço pelo tempo de 10 min. Aspirou-se o metanol e acrescentou-se no poço 50 µL de Cristal Violeta 0,2% por 3 min e a placa passou por processos de lavagem com PBS para posterior adição de 200 µL de citrato de sódio pelo tempo de 10 min para ser levada para leitura. Foi selecionado o método de cristal violeta pelo fato deste corante ter a capacidade de se intercalar ao DNA de células vivas, garantindo uma maior confiabilidade aos ensaios *in vitro*. Para cada concentração, foram realizadas triplicatas, para cálculo da média de porcentagem de viabilidade e desvio-padrão.

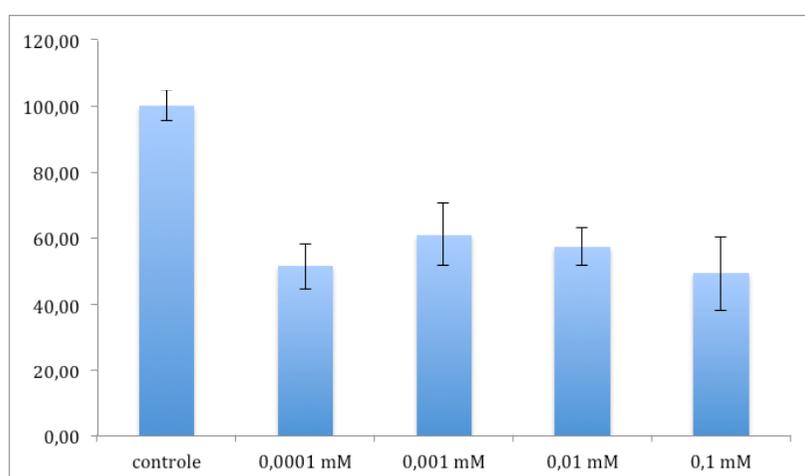
## 2.6 Análise de morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As células cultivadas e tratadas nas lamínulas da placa de 06 poços foram submetidas a procedimento de fixação com glutaraldeído e desidratação em concentrações crescentes de etanol, em seguida a placa foi enviada para a Universidade Estadual de Ponta Grossa onde, após

submetida à metalização, as lamínulas com as células foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura em microscópio Shimadzu, Kyoto, Japão.

### 3 Resultados e Discussão

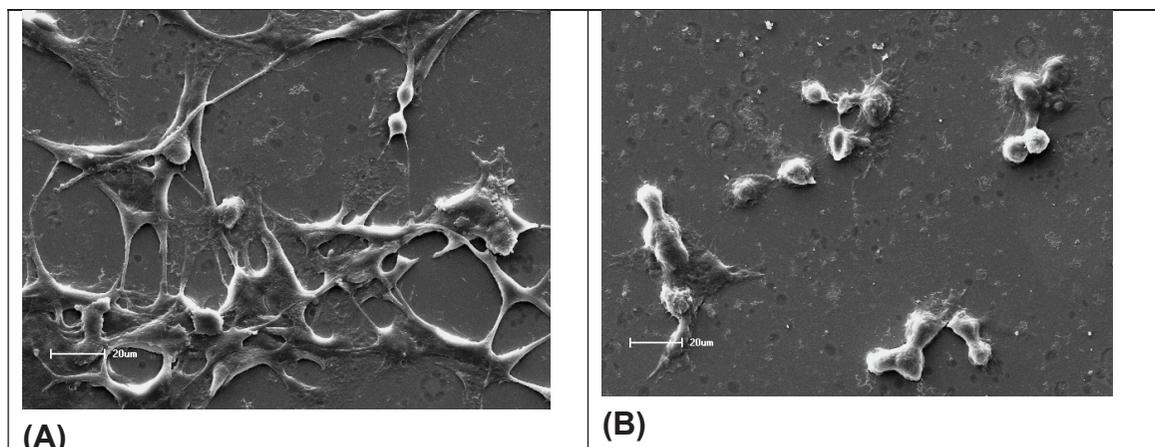
Compostos de vanádio apresentam uma potencial ação antitumoral, podendo ser observada esta função tanto *in vitro* como *in vivo* (NUNES et al, 2012). Por este motivo, foram realizados testes *in vitro* com células de melanoma (B16F10), utilizando o composto  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$ . Foram utilizadas diversas concentrações do composto (0,1mM; 0,01mM; 0,001mM; 0,0001mM), analisando após o tratamento a viabilidade destas células. Os resultados deste ensaio podem ser observados na figura 1.



**FIGURA 1.** Gráfico de viabilidade celular com o composto  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$

A viabilidade celular é a capacidade da célula de se reproduzir, crescer, apresentando uma atividade metabólica. Sendo assim, pode-se observar que a viabilidade das células tratadas com o composto apresentou uma redução de crescimento de 40 a 60%, em comparação com o controle, mostrando um efeito citotóxico do composto avaliado nas células de melanoma B16F10.

Como um dos problemas encontrados na utilização do vanádio é seu efeito tóxico ao organismo humano em certas doses, através do resultado, podemos observar que a solução mais concentrada (0,1mM) apresentou praticamente a mesma ação da que foi utilizada em menor concentração (0,0001mM), interferindo na viabilidade da célula neoplásica de forma equivalente. Este gráfico responde à necessidade de eficácia do tratamento aliada à segurança, tendo em vista que mesmo a uma baixa concentração de vanádio obteve-se um efeito citotóxico à célula neoplásica, o que agrega menor índice de efeito colateral ao paciente.



**FIGURA 2.** Micrografias de MEV x 500 das células B16F10 representadas em: (A) células tratadas somente com meio de cultivo e (B) células tratadas com  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$  em meio de cultivo

Os resultados da morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura corroboraram com os resultados de citotoxicidade. As células do grupo (A) representam células de melanoma B16F10 tratadas somente com meio de cultivo. Elas exibem morfologia dendrítica característica, de prolongamentos citoplasmáticos que quando comparadas ao grupo (B) de células tratadas com o  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$  (0,0001 mM) se diferencia por uma morfologia alterada com formato arredondado e tamanho pequeno com limites de célula mal definidos, sugerindo necrose da célula tumoral.

#### 4 Conclusão

A partir dos resultados deste trabalho, através da análise de viabilidade celular após o tratamento com o composto de vanádio  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$ , conclui-se parcialmente que, este composto agiu interferindo na funcionalidade das células B16F10, diminuindo sua viabilidade, concordando com resultados já descritos para outros complexos de vanádio. O presente estudo revelou uma interessante atividade antitumoral de um oxovanadato inédito na literatura. É perceptível a importância deste composto de vanádio, mas para sua utilização em terapias antitumorais, estudos complementares deverão ser realizados, buscando um maior aprofundamento sobre a atividade biológica deste metal associado a outros íons de metais de transição.

#### Referências

BISHAYEE, A. et al. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence. *Cancer Lett* 294:1-12, 2010.

BODEN, G. et al. Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*; 45: 1130–1135, 1996.

BOISSY, RE. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. *Dermatol*



Clin.;6:161-73, 1988.

COHEN, N. et al. Oral vanadyl sulfate improves hepatic and periferal insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, 1995.

DESOIZE, B. Metal and Metal Compounds in Cancer Treatment. Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté de Pharmacie, 51 rue Cogmaq-Jay, 51096, France. Review. Antican Research 24: 1529-1544, 2004.

EVANGELOU, A.M. Vanadium in cancer treatment. Crit Rev Oncol Hematol 42: 249-265, 2002.

GASSER G, Ott I, Metzler-Nolte N. J Med Chem 54(1):3–25, 2011.

GOLDFINE, A.B, Simonson, D.C, Folli, F, Patti, M.E, and Kahn, C.R. Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. Clin. Endocrinol. Metabol. 80: 3311–3320, 1995.

HARTINGER, CG. DYSON, PJ. Chem Soc Rev 38(2):391–401, 2009.

LIN JY, et al. Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature. 2007; 445:843-50, 2007

MALUF, D. F., et al. Therapy of adrenocortical cancer: present and future. American Journal of Cancer Research; 1(2):222-232, 2011.

NRIAGU, JO. History occurrence and uses of vanadium. In: Nriagu JO, editor. Vanadium in the environment. New York: Wiley, p.1–24, 1998.

NUNES, G.G.; BONATTO, A.C.; de ALBUQUERQUE, C.G.; BARISON, A.; RIBEIRO, R.R.; BACK, D.F.; ANDRADE, A.V.C.; de SÁ, E.L.; PEDROSA, F.D.O.; SOARES, J.F.; DE SOUZA, E.M., Synthesis, characterization and chemoprotective activity of polyoxovanadates against DNA alkylolation, J. Inorg. Biochem., 108, 36-46, 2012.

SOMERVILLE, J and Davies, B. Effects of vanadium on serum cholesterol. Am. Heart J. 1992; 64: 54–56.

STANLEY MA. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol; 15:663-76, 2001

WAINSTEIN, A.J.A; BELFORT, F.A. Conduta para o melanoma cutâneo. Rev. Col. Bras. Cir. vol. 31, no.3, 2004.

ZACHARIAS, DPM. et al. Melanoma cutâneo. In: Mélega JM. Cirurgia plástica fundamentos e arte: princípios gerais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.361-370, 2009.