

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE VANÁDIO
(NH₄)₇[H₆V₁₄O₃₈(PO₄)]·9H₂O E VO(ACAC)₂ EM CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA
(B16F10)**

*Fernando N. C. Navarro¹, Fernanda Pielak², Kahoana Postal³, Camila N. De M. Ribeiro⁴,
Giovana G. Nunes⁵, Jaísa F. Soares⁶, Daniela F. Maluf⁷*

RESUMO

O câncer é uma patologia de interesse mundial, pois afeta destrutivamente o organismo daqueles que são acometidos a ponto de levá-los a óbito. As medidas usadas para o tratamento, como a quimioterapia e radioterapia, também são agressivas à saúde do paciente. Considerando tal panorama, observa-se uma grande necessidade de pesquisa de fármacos que apresentem atividade biológica antitumoral mas que não sejam tóxicos ao paciente. Dentre estes compostos, as pesquisas relacionadas a derivados metálicos tem despertado interesse crescente para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, desde o advento da cisplatina. O objetivo deste trabalho é avaliar comparativamente, em linhagem de células tumorais B16F10, a potencial citotoxicidade de dois compostos de vanádio; um ainda não testado o V14 (NH₄)₇[H₆V₁₄O₃₈(PO₄)]·9H₂O, e outro com resultados já descritos na literatura para outras linhagens tumorais, o VO(acac)₂. Os compostos foram avaliados por dois métodos diferentes para determinação da viabilidade celular: azul de tripan e cristal violeta. Os resultados demonstraram que ambos os compostos testados apresentaram citotoxicidade para as células de melanoma na mesma faixa de concentração, 10 mM.

Palavras-chave: Vanádio, Melanoma, Citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is a disease of worldwide interest, because it affects destructively those who are, with the point of taking them to death. The measures used for treatment, such as chemotherapy and radiotherapy are also aggressive to the patient health. Whereas such panorama, there is a great need for research of drugs that exhibit antitumor activity but which are non toxic to the patient. Among these compounds, metal derivatives research has aroused growing interest for the development of new antitumor drugs, since the advent of cisplatin. The aim of this work is to assess comparatively, in tumor cell line B16F10, the potential cytotoxicity of two vanadium compounds; one not tested until now, the V14 (NH₄)₇[H₆V₁₄O₃₈(PO₄)]·9H₂O, and another with results already described in the literature for other neoplastic cell lines, VO(acac)₂. The compounds were evaluated by two different methods for determination of cell viability: Trypan Blue and Crystal Violet. The results showed that both tested compounds showed cytotoxicity to melanoma cells in the same concentration range, 10 mM.

Keywords: Vanadium, Melanoma, Cytotoxicity.

¹Acadêmico de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Acadêmica de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

³Farmacêutico, Doutor em Processos Biotecnológicos. Coordenador do Curso de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁴Química, Mestranda do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁵ Química, Doutora em Química, Professora e Pesquisadora do Departamento de Química- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁶Química, Doutora em Química, Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁷Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas, Professora adjunta do curso de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Oncogênese

As células se multiplicam quando recebem sinais de fatores de crescimento, que agirão sobre várias moléculas intracelulares como as ciclinas e cinases dependentes de ciclinas, que coordenam as fases do ciclo celular, impedindo que erros se perpetuem e venham a comprometer a função celular, e, até mesmo, a divisão. Mutações nas sequências que determinam os mecanismos de checagem e reparos do material genético permitem o desenvolvimento de neoplasias. Os danos ao DNA, que originam as mutações, são eventos relativamente frequentes e podem resultar da ação de agentes físicos (radiações ionizantes e não-ionizantes), de agentes químicos (substâncias genotóxicas existentes na natureza ou introduzidas pelo homem), de substâncias produzidas endógenamente (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), de infecções por alguns vírus oncogênicos, como por exemplo, Papovavírus: polyoma, SV40; Adenovírus; Hepadnavírus: hepatite B; Retrovírus: Sarcoma de Rous). Além das mutações induzidas por agentes físicos, químicos e infecciosos, mutações espontâneas podem surgir a partir de eventos normais, como a depurinação e desaminação do DNA, por danos ao DNA induzidos por radicais livres produzidos pelo metabolismo celular e erros no processo de replicação do DNA durante a divisão celular (NOWELL *et al.*, 1975).

Os genes que atuam de forma positiva, induzindo ou estimulando a progressão do ciclo, são chamados proto-oncogenes pois ao sofrerem mutações se tornarão oncogenes, cuja ação permitirá ganho de função à célula mutante. Os produtos resultantes da ativação destes genes atuam de forma dominante, isto é, a mutação de um único alelo poderá ser suficiente para conferir à célula uma vantagem em termos de crescimento ou transformação, levando à neoplasia (WARD, 2000).

As proteínas envolvidas no controle negativo do ciclo celular são codificadas pelos assim chamados genes supressores tumorais, como p53, RB, APC, DPC4, p16 entre outros. Os genes supressores tumorais atuam de forma recessiva, isto é, ambos os alelos devem estar perdidos ou não-funcionantes (WEINBERG, 1989; WARD, 2000; MALUF *et al.*, 2011).

Os genes que regulam a apoptose podem ser dominantes, como os proto-oncogenes, ou podem se comportar como genes supressores do tumor. Os genes de reparo do DNA afetam a proliferação celular ou a sobrevivência de modo indireto ao influenciar a capacidade do organismo de reparar uma lesão não letal nos outros genes, como os que regulam a apoptose. A incapacidade dos genes de reparo do DNA pode predispor mutações no genoma e conseqüentemente a transformação neoplásica, com algumas exceções, ambos os alelos de reparo do DNA devem ser inativados para induzir instabilidade genômica (ROBBINS & COTRAN, 2005).

1.2 Linhagem de melanoma murino B16-F10

O melanoma cutâneo é um tumor de origem neuroectodérmica pouco comum. Forma-se a partir dos melanócitos, células que produzem melanina, que, por sua vez, migram da crista neural

para toda a epiderme durante a embriogênese. Em consequência desse fato, o tumor apresenta grande capacidade de fazer metástase mesmo no início, já que a característica de invadir e disseminar poderia ser considerada uma característica inata destas células (WAINSTEIN *et al.*, 2004; BIONDI, 2006).

Estudos epidemiológicos demonstram claramente a relação direta entre radiação ultravioleta e carcinoma de células escamosas e de células basais, mas a relação entre o melanoma e exposição solar é menos evidente (CARDOSO *et al.*, 2009).

As células de melanoma murino B16-F10, são células de linhagem contínua, extraídas inicialmente de camundongo, que resistem a inúmeras passagens. Vários experimentos usaram esta linhagem, por se tratarem de células relativamente fáceis de se manusear e manter em cultivo. Entre muitos trabalhos com essa linhagem, é possível destacar:

Tabela 1- Breve relação de trabalhos realizados nos últimos anos utilizando linhagem B16F10 para estudos de citotoxicidade

Endogenous lung surfactant inspired pH responsive nanovesicle aerosols: Pulmonary compatible and site-specific drug delivery in lung metastases	Scientific Report, 2014
Avaliação de citotoxicidade de óleos essenciais de <i>Endlicheria citriodora</i> , uma Lauraceae rica em geranato de metila	Química Nova, 2013
Potential use of snake venom components in cancer treatment	Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica, 2012
Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10	Rev. Bras. Farmacogn., 2007
Cytotoxicity of nanosize V2O5 particles to selected fibroblast and tumor cells	Toxicology in vitro, 2006

1.3 O papel dos compostos de vanádio associados à atividade antitumoral

O efeito antitumoral de compostos de vanádio foi investigado em uma grande variedade de linhagens de células malignas, incluindo o linfoma de células B humanas e de leucemia de células T, eritroleucemia murino, leucemia basofílica de rato, linhagens leucêmicas de células L1210, HL-60 e M07e (de humano e de rato), hepatoma, carcinoma do ovário humano, cancro testicular, carcinoma da nasofaringe, carcinoma da laringe, osteossarcoma, bem como tumor de Ehrlich, neuroblastoma, glioma de rato, carcinoma pulmonar de Lewis e Hela (EVANGELOU, 2002).

O vanádio tem demonstrado reduzir a ocorrência de câncer, possivelmente, interceptando agentes alquilantes antes que ocorra reação com o DNA. De acordo com resultados mais recentes, sais óxido-nucleofílicos de vanádio podem evitar a alquilação de DNA. O estado de oxidação do vanádio parece também ser determinante para os efeitos biológicos dos compostos de vanádio (KREJSA *et al.*, 1997; FAUSTCH. *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2012).

Os mecanismos moleculares pelos quais os compostos de vanádio tem demonstrado contribuir para a atividade antitumoral, incluem: a) ativação de MAPKs (proteínas quinase mitógeno-ativadoras responsáveis pela transcrição do fator NF-KB relacionado à apoptose celular); b) elevação

de enzimas de conjugação (reduzem a concentração intracelular de reativos carcinogênicos); c) ativação do gene p53 (conhecido como gene “guardião do genoma”, interrompe o progresso do ciclo celular quando detectada mutação e induz à apoptose celular); d) ação sobre a glicoproteína P (compostos de vanádio reduzem o efluxo celular de fármacos como a cisplatina por atuarem nesta proteína multi-droga resistente); e) Diminuição da expressão da óxido nítrico sintase (iNOS causa a desaminação de bases no DNA gerando injúria genômica) e, por fim, g) Inibição das PTPs (proteínas tirosina fosfato que desfosforilam a subunidade do complexo ciclina B, afetando a adesão célula-célula) (EVANGELOU, 2002; DESOIZE, 2004; BISAHAYEE, 2010;)



Figura 1- Esquema dos mecanismos moleculares de ação antitumoral atribuídos a compostos de vanádio

Outros efeitos biológicos dos compostos de vanádio têm sido descobertos, tais como uma ação biologicamente funcional semelhante à insulina (TSIANI; FARDEL, 1997).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos: Centrífuga MPW high speed brushless centrifuge MPW-350R, Vortex Quimis Q-220A, Balança analítica Boeco Germany max 210g d=0,1mg, Banho-maria Fanem mod 100, Microscópio de fase invertido Medilux N.A. 0.3, Leitora de microplaca Biotek EL 800, Estufa de CO₂ Shel lab mod 5115, Fluxo laminar VECO Bio seg 09, Microscópios Taimin TM 212 e Bioval LIIooA, Chapa de aquecimento Quimis mod 261.1, Micropipetas Labmate 20-200 µL e Peguepet 100-1000 µL, Estufa para esterilização e secagem Nevoni mod 1.3.

Reagentes: Meio de cultura RPMI-1640 tamponado (Vitrocell Embriolife/Brasil), Soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife/Brasil), Solução antibiótica penicilina/estreptomicina 100 U.I./100 µg/

mL (Vitrocell Embriolife/Brasil), Solução de tripsina 0,5% (Vitrocell Embriolife/Brasil), Solução de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich/EUA), DMSO e Metanol (Merck/Alemanha), Solução de Azul de Tripán 0,2%, Solução de Cristal Violeta 0,2%, Solução de citrato de sódio 0,05 M, Tampão fosfato pH 7,4.

Insumos: Garrafas de cultivo estéreis, placas de 24 poços estéreis, placas de 96 poços estéreis, pipetas estéreis e câmara de Neubauer.

2.1 Tratamento das células B16F10 com os compostos $(\text{NH}_4)_7[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)] \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (V14) e $\text{VO}(\text{acac})_2$

As células foram semeadas em placas de 96 poços ($3 \cdot 10^3$ células/poço) e incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 . Após adesão, as células foram tratadas em concentrações crescentes com os compostos dissolvidos em meio RPMI, em triplicata: V14 (0,02 mM, 0,2 mM, 2 mM, 4 mM, 10 mM e 20 mM) e $\text{VO}(\text{acac})_2$ (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM); além de células tratadas somente com o meio de cultura (controle). Após o tratamento as placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO_2 pelos períodos de 24 e 48 horas.

2.2 Análise da viabilidade celular do $(\text{NH}_4)_7[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)] \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e $\text{VO}(\text{acac})_2$ pelo método do Cristal Violeta

Após o período de incubação, os poços foram lavados duas vezes com tampão fosfato e as células foram fixadas com metanol por 10 minutos. Em seguida, foi acrescentada a solução de cristal violeta 0,2% e deixada em repouso por 3 minutos. Os poços foram lavados com tampão fosfato até remoção do excesso do corante e tratados com a solução de citrato de sódio 0,05 M. A absorbância foi medida em leitora de microplaca no comprimento de onda de 540 nm.

2.3 Análise da viabilidade celular do $(\text{NH}_4)_7[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)] \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e $\text{VO}(\text{acac})_2$ pelo método do Azul de Tripán

O meio de tratamento foi aspirado e cada poço foi lavado com tampão fosfato. Em seguida, as células foram submetidas à ação da tripsina por 3 minutos e ressuspensas em meio de cultura RPMI contendo 20% de SFB. Uma alíquota de 10 μL de cada poço foi misturada a 10 μL da solução de azul de tripan para contagem em câmara de Neubauer.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método do cristal violeta avalia a viabilidade celular por corar o núcleo das células vivas, pois intercala-se entre as fitas de DNA. Já o método do azul de tripan, é conhecido como método

de exclusão pois cora o citoplasma das células mortas, fazendo com que o corante permaneça no seu interior. A soma dos dois métodos geram resultados que se complementam e, portanto, mais fidedignos.

Conforme os resultados obtidos da leitura em 24 horas do composto $\text{VO}(\text{acac})_2$ pelo método do cristal violeta (Figura 2A), foi observado um aumento da viabilidade celular na menor concentração empregada (0,01 mM). Já na leitura em 48 horas (Figura 2B), este efeito desaparece e assim, este composto não aparenta ter ação citotóxica sobre a linhagem B16F10 nas concentrações utilizadas, mesmo que tenha sido descrito na literatura citotoxicidade em outras linhagens como SH-SY5Y e SK-N-SH (células de neuroblastoma humano) (LIAO et al., 2013).

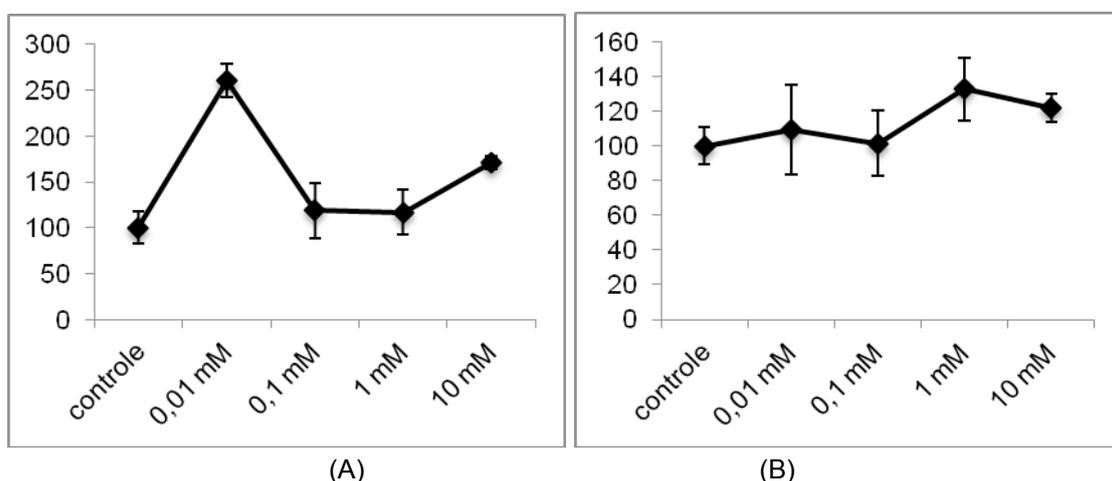


Figura 2- Gráfico de viabilidade celular do $\text{VO}(\text{acac})_2$ pelo método do cristal violeta com leituras em 24 horas (A) e 48 horas (B).

A concentração de 10 mM do $\text{VO}(\text{acac})_2$ no tempo de 48 horas, pelo método do azul de tripan, resultou em significativa morte celular. Este resultado pode ter sido mascarado pelo método do cristal violeta, tendo em vista que o composto apresenta coloração verde, ainda mais intensa na concentração mais alta.

Os resultados do V14 pelo método do cristal violeta com leitura em 48 horas (Figura 3B), demonstraram um efeito citotóxico a partir da concentração de 10 mM. Os resultados obtidos pelo método do azul de tripan, corroboraram com os resultados obtidos pelo método do cristal violeta, exceto na concentração de 20 mM com leitura em 24 horas (Figura 3A), em que houve um aumento da absorvância devido à cristalização do composto na placa, dado este observado ao microscópio.

O composto $(\text{NH}_4)_7[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)] \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, ou V14, ainda não foi testado em nenhuma linhagem celular descrita na literatura. Neste trabalho sua atividade biológica foi testada em células de melanoma (B16F10) e comparada à atividade de um composto de vanádio com ação citotóxica conhecida e comercialmente disponível, o $\text{VO}(\text{acac})_2$. Os resultados indicam que o composto V14 apresenta citotoxicidade na mesma faixa de concentração que o $\text{VO}(\text{acac})_2$, a partir de 10 mM, na linhagem testada.

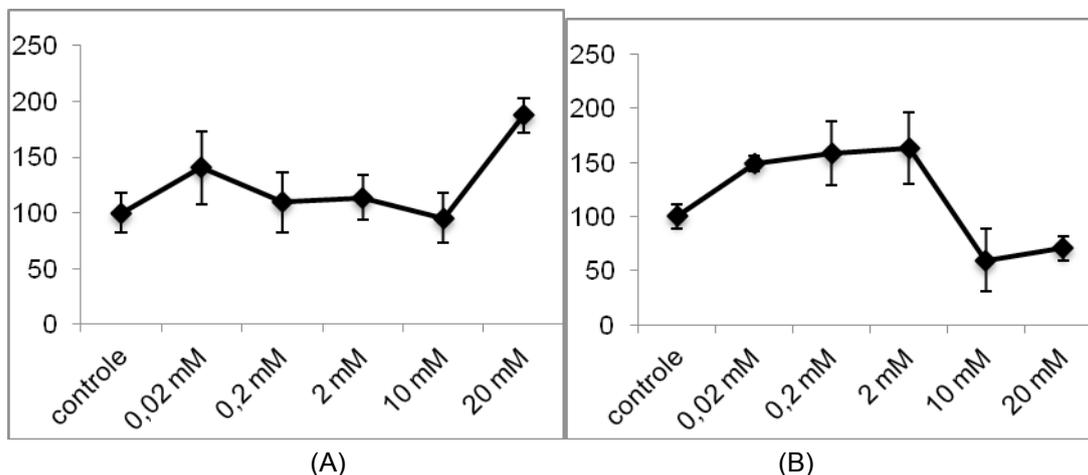


Figura 3- Gráfico de viabilidade celular do $(\text{NH}_4)_7[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)] \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ pelo método do cristal violeta com leituras em 24 horas (A) e 48 horas (B).

Ao se comparar um método que utiliza espectrofotometria com outro método que utiliza a contagem em microscópio, o método do azul de tripan é de grande valia para provas confirmatórias no ensaio de viabilidade celular de compostos de vanádio coloridos, pois a absorvância dos compostos pode causar interferência, fornecendo assim resultados pouco confiáveis.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível conhecer a atividade citotóxica de dois compostos de vanádio em cultivo de células de melanoma B16F10, o $(\text{NH}_4)_7[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)] \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e o $\text{VO}(\text{acac})_2$. Ambos os compostos apresentaram citotoxicidade para as células de melanoma e na mesma faixa de concentração, 10 mM. Outras linhagens tumorais e não-tumorais devem ser testadas a fim de contribuir com uma melhor investigação sobre os efeitos destes compostos e possível desenvolvimento de protótipo para estudos clínicos.

REFERENCIAS

- BIONDI, L. R. Influência do hipotireoidismo na progressão do melanoma experimental. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2006.
- BISHAYEE A., WAGHRAY A., PATEL M.A., CHATTERJEE M. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence. *Cancer Lett* 294:1-12, 2010.
- CARDOSO, D.; DUARTE, D.O.; MACHADO, F.S.; VIEIRA, R.J.; VASCONCELOS, V.A.; BINS-ELY, Z.; NEVES, J. Melanoma cutâneo no Brasil. *Arquivos Catarinenses de Medicina - Volume 38 - Suplemento 01*, 2009.
- DESOIZE, B. Metal and Metal Compounds in Cancer Treatment. Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, EA3306, IFR53, Faculté de Pharmacie, 51 rue Cogmaq-Jay, 51096 Reis cedex, France. *Review. Anticancer Research* 24: 1529-1544. 2004.

- EVANGELOU A.M. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 42: 249-265, 2002.
- FAUSTCH, J.M.; FANWICK, P.; WILKER, J. Oxido vanadium Complexes for the Consumption of Alkylating Toxins. DOI: 10.1002/ejic.2008949. 2008.
- IVANKOVIĆA, S.; MUSIĆB, S.; GOTIĆB, M.; LJUBEŠIĆC, N. Cytotoxicity of nanosize V₂O₅ particles to selected fibroblast and tumor cells. *Toxicology in vitro*. Volume 20, ed. 3, pag 286–294, 2006.
- JOSHI, N.; SHIRSATH, N.; SINGH, A.; JOSHI, K.S.; BANERJEE, R. Endogenous lung surfactant inspired pH responsive nanovesicle aerosols: Pulmonary compatible and site-specific drug delivery in lung metastases *Scientific Reports* 4, doi:10.1038/srep07085, 2014.
- KLENICY, K. L.; YAMAGUCHI, VEIGA-JUNIOR, V.F.; PEDROSA, T.N.; VASCONCELLOS, M.C.; LIMA, E.S. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. *Quim. Nova*, Vol. 36, No. 6, 826-830, 2013.
- KREJSA, C.M.; NADLER S.G.; ESSELSTYN, J.M.; KAVANAGH, T.J.; LEDBETTER, J.A.; SCHIEVEN, G.L. Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF-kappaB. *J Biol Chem* 272: 11541-11549, 1997.
- LIAO, X.; LU, J.; YING, P.; ZHAO, P.; BAI, Y.; LIU, W.L.M. DNA binding, antitumor activities, and hydroxyl radical scavenging properties of novel oxovanadium(IV) complexes with substituted isoniazid. *J Biol Inorg Chem* 18:975–984, 2013.
- MALUF, D. F.; OLIVEIRA, B. H.; LALLI, E. Therapy of adrenocortical cancer: present and future. *American Journal of Cancer Research*; 1(2):222-232, 2011.
- NOWELL, P.C.; JENSEN, J.; GARDNER, F. Two complex translocations in chronic granulocytic leukemia involving chromosomes 22, 9 and a third chromosome. *Humangenetik* 1975; 30:13-21, 1975.
- 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 alkylation, *J. Inorg. Biochem.*, 108, 36-46, 2012.
- ROBBINS & COTRAN. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. Rio de Janeiro. Ed. Elsevier, 3 ed, 2005.
- SOUZA, W.M.; BREHMER, F.; NAKAO, L.S. STINGHEN, A.E.M.; SANTOS, C.A. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2): 191-196, 2007.
- TSIANI, E.; FARDEL, O. Vanadium compounds. Biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends Endocrinol Metab* 8: 51-58, 1997.
- VIVAS, D. INGA, R. YARLEQUÉ, A. Potential use of snake venom components in cancer treatment. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* vol.29 n.3, 2012.
- WAINSTEIN, A.J.A; BELFORT, F.A. Conduta para o melanoma cutâneo. *Rev. Col. Bras. Cir.* vol. 31, no.3, 2004.
- WARD, L.S. Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. *Rev Bras Clin Terap* 2000;26:103-7, 2000.
- WEINBERG, R. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49:3713-21, 1989.