

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E APOPTÓTICO DO COMPLEXO DE RUTÊNIO (II) AU16 EM SARCOMA 180

Alessandra de Santana Braga Barbosa RIBEIRO¹; Elisângela de Paula SILVEIRA-LACERDA^{1*} Flávia de Castro PEREIRA¹; Aliny Pereira LIMA¹; Cesar Augusto Sam Tiago VILANOVA-COSTA¹; Alzir Azevedo BATISTA².

¹Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brasil;

²Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP - Brasil

*e-mail: silveiralacerda@gmail.com

Palavras-chave: Apoptose, Au16, Citotoxicidade, Ciclo celular, Ensaio Cometa

1.0 Introdução

Os compostos de rutênio (II e III) vêm sendo estudados, pelo fato de demonstrarem atividade antimetastática e essa propriedade representa um importante marco no desenvolvimento de novas drogas antitumorais (Sava et al., 1999). Através de três propriedades principais do rutênio que fazem com que seus derivados sejam bem apropriados para aplicações biológicas: mudança de ligante, estados de oxidação e o mimetismo com o ferro (Claire & Dayson, 2003), os complexos de rutênio vêm tornando-se uma das formas mais promissoras de tratamento, uma vez que sua ação sistêmica possibilita o acesso a metástases e tumores líquidos (Barbosa et al., 2007). Drogas antitumorais a base de complexos de rutênio vem atraído interesse crescente nos últimos 20 anos e dois deles entraram em ensaios clínicos (Bergamo e Sava, 2011). Dentre os vários complexos a base de metais desenvolvidos, os complexos de rutênio (II) representam uma nova família de promissores agentes antitumorais. No presente estudo foi investigado a citotoxicidade, genotoxicidade e apoptose em Sarcoma 180 in vitro com um novo complexo de rutênio, Au16.

2.0 Materiais e Métodos

Os compostos de coordenação baseados em Rutênio (II) foram sintetizados pelo Laboratório de Química Supramolecular do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos.

2.1 Linhagem Celular

As células de tumor ascítico de murino Sarcoma 180 foram cultivadas de acordo com os critérios do ATCC (American Type Culture Collection - ATCC, Rockville, MD, USA).

2.2 Citotoxicidade

A partir do teste de MTT foi obtido o IC50 (concentração citotóxica para 50% das células) e a partir deste estabelecidas as concentrações a serem utilizadas em todos os ensaios, sendo escolhida uma concentração acima e uma abaixo do IC50.

2.3 Ensaio Cometa

A versão alcalina do ensaio cometa (single-cell gel electroforesis) foi seguida de acordo com Singh et al. (1988), com pequenas modificações. Foi utilizado um microscópio de fluorescência (Leica-Application Suite V3) equipado com filtro de excitação de 560nm, um filtro de barreira de 590nm, e ampliação de 400x. Os cometas foram classificados pelo software CometScore 15.

2.4 Citometria de fluxo

2.4.1 Apoptose

As células (5 x 10⁵ célula/poço) foram cultivadas em placas de 12 poços por 24 e 48 horas e tratadas com concentrações pré-estabelecidas. Para o ensaio da anexina V foi utilizado o kit de detecção de apoptose por Anexina-V marcada com FITC (Becton Dickinson, USA). A intensidade de fluorescência (FITC e iodeto de propídio) foi avaliada utilizando o equipamento FACSCalibur (Becton Dickinson, USA).

2.4.2 Ciclo Celular

Após o período de incubação, a intensidade da fluorescência foi determinada através de citometria de fluxo quantitativa, utilizando o Citômetro de Fluxo FACS Callibur (Becton Dickinson, USA). A fluorescência vermelha do iodeto de propídio foi excitada por comprimento de onda de 488nm e detectada a 620-700nm no filtro.

2.5 Estatística

Para verificar diferenças significativas entre os grupos estudados serão aplicados através de softwares (GraphPad Prism ou SPSS), os testes de análise de variância (ANOVA). Quando detectada diferença significativa entre os grupos, será aplicado o teste de contraste de Tukey.

3 Resultado e Discussão

3.1 Citotoxicidade (MTT)

O composto de Rutênio Au16 apresentou atividade citotóxica frente às células de Sarcoma 180 entre as concentrações de (0.2-200 µM) apresentando uma IC50 de 0,6 µM.

3.2 Ensaio Cometa

O ensaio cometa mostrou que a exposição do complexo de Rutênio Au16 causou aumento de danos no DNA de células de Sarcoma 180 (Figura 1).

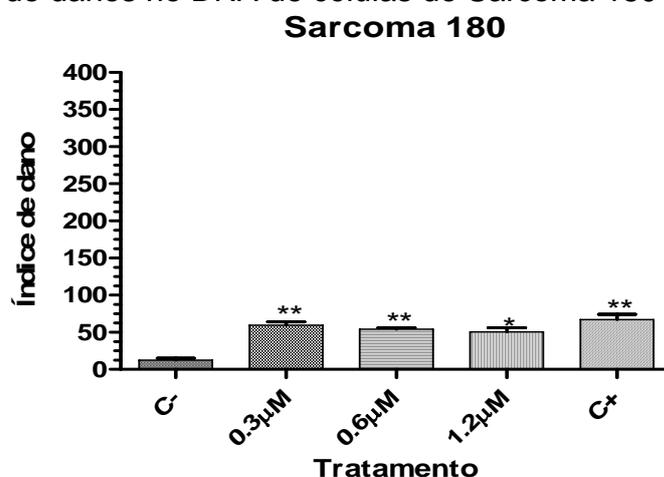


Figura 1: Índice de dano ao DNA de células de S-180 quando tratadas com diferentes concentrações do composto de Rutênio Au16 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.3 Anexina V

As células (figura 2a) expostas na concentração de 1.2 μM apresentaram diminuição da viabilidade de $87,3 \pm 1,8\%$ e aumento da apoptose de $5,6 \pm 1,0$ e apoptose tardia de $6,0 \pm 1,0\%$ (** $p < 0.001$). As outras concentrações testadas não mostraram diferença estatística quando comparada ao controle. O experimento de 48h (figura 2b) mostrou diminuição da viabilidade de $3,9 \pm 0,8\%$, aumento da apoptose de $15,3 \pm 0,9\%$, apoptose tardia de $76,5 \pm 0,8\%$ e necrose de $4,6 \pm 0,1\%$ (** $p < 0.001$), na concentração de 1.2 μM . As outras concentrações não revelaram diferença estatística quando comparadas ao controle.

Tabela 1. Média e Desvio padrão do experimento de 24 horas (** $p < 0.001$).

Tratamento	Viabilidade	Apoptose	Apoptose tardia	Necrose
C-	$96,5 \pm 2,6$	$1,1 \pm 0,5$	$1,9 \pm 1,7$	$0,5 \pm 0,5$
Au 16 0,3 μM	$94,5 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,1$
Au 16 0,6 μM	$94,4 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$
Au 16 1,2 μM	$87,3 \pm 1,8^{***}$	$5,6 \pm 1,0^{***}$	$6,0 \pm 1,0^{***}$	$1,1 \pm 0,1$

Tabela 2. Média e Desvio padrão de experimento de 48 horas (** $p < 0.001$).

Tratamento	Viabilidade	Apoptose	Apoptose tardia	Necrose
C-	$94,3 \pm 2,3$	$3,9 \pm 2,3$	$1,1 \pm 1,1$	$0,42 \pm 0,2$
Au 16 0,3 μM	$94,1 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,3$	$0,78 \pm 0,1$
Au 16 0,6 μM	$93,7 \pm 0,9$	$3,4 \pm 0,7$	$2,3 \pm 0,2$	$0,68 \pm 0,2$
Au 16 1,2 μM	$3,9 \pm 0,8^{***}$	$15,3 \pm 0,9^{***}$	$76,5 \pm 0,8^{***}$	$4,6 \pm 0,1^{***}$

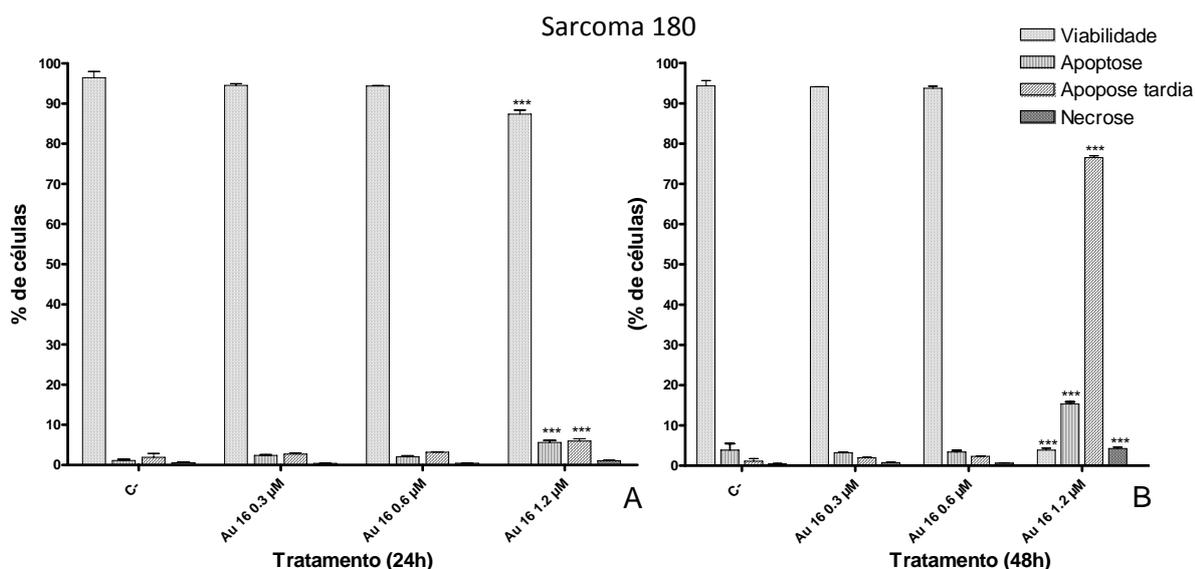


Figura 2A e 2B. Atividade apoptótica do composto Au16 frente a linhagem tumoral S180. (***) $p < 0.001$

3.4 Ciclo Celular

Como mostrado na tabela 3 ocorreu um significativo acúmulo de células nas concentrações de 0,3, 0,6 e 1,2 μ M, na fase G1 de $45 \pm 3,3$, $52 \pm 1,2$ e $46,1 \pm 0,2\%$ e na fase G2 de $19,9 \pm 3,2$, $21,8 \pm 0,8$ e $31,6 \pm 1,2\%$, respectivamente (***) $p = 0,001$), uma diminuição de células na fase S de $35,1 \pm 1,6$, $26,2 \pm 0,4$, $22,3 \pm 1,3\%$ ($p = 0,001$) e aumento de apoptose nas concentrações de 0,6 e 1,2 μ M de $3,7 \pm 0,5$ e $5,1 \pm 0,2\%$, respectivamente.

Tabela 3. Média e Desvio padrão de experimento de 24 horas (***) $p < 0.001$.

Tratamento	G1	Síntese	G2	Apoptose
C-	$19 \pm 1,4$	$70,7 \pm 1,9$	$10,3 \pm 0,5$	$0,9 \pm 1,3$
Au 16 0,3 μ M	$45 \pm 3,3^{***}$	$35,1 \pm 1,6^{***}$	$19,9 \pm 3,2^{***}$	$0,2 \pm 0,1$
Au 16 0,6 μ M	$52 \pm 1,2^{***}$	$26,2 \pm 0,4^{***}$	$21,8 \pm 0,8^{***}$	$3,7 \pm 0,5$
Au 16 1,2 μ M	$46,1 \pm 0,2^{***}$	$22,3 \pm 1,3^{***}$	$31,6 \pm 1,2^{***}$	$5,1 \pm 0,2$

Na tabela 4, apresentou aumento em G1 de $63,1 \pm 2,2\%$ (** $p < 0.01$) e S de $20,1 \pm 1,0\%$ (* $p < 0.05$) na concentração de 0,3 e aumento em G1 de $29,9 \pm 1,6\%$ S de $60,0 \pm 0,5\%$, G2 de $31,6 \pm 1,2\%$ e apoptose de $37,5 \pm 4,6\%$ na concentração de 1.2 μ M (***) $p < 0.001$). Mostrando uma diminuição de G1 e G2 e aumento de S e apoptose, sugerindo que nessa concentração o ciclo celular parou em G2 entrou em chek point e ocorrendo morte celular programada

Tabela 4. Média e Desvio padrão de experimento de 48 horas (***) $p < 0.001$.

Tratamento	G1	Síntese	G2	Apoptose
C-	51,2±1,2	28,5±0,5	20,2±1,7	2,7±0,3
Au 16 0,3 µM	63,1±2,2**	20,1±1,0*	16,8±1,2	4,2±1,5
Au 16 0,6 µM	57,7±0,2	27,4±1,0	16,9±0,9	7,6±3,5
Au 16 1,2 µM	29,9±1,6***	60,0±0,5***	10,1±1,0*	37,5±4,6***

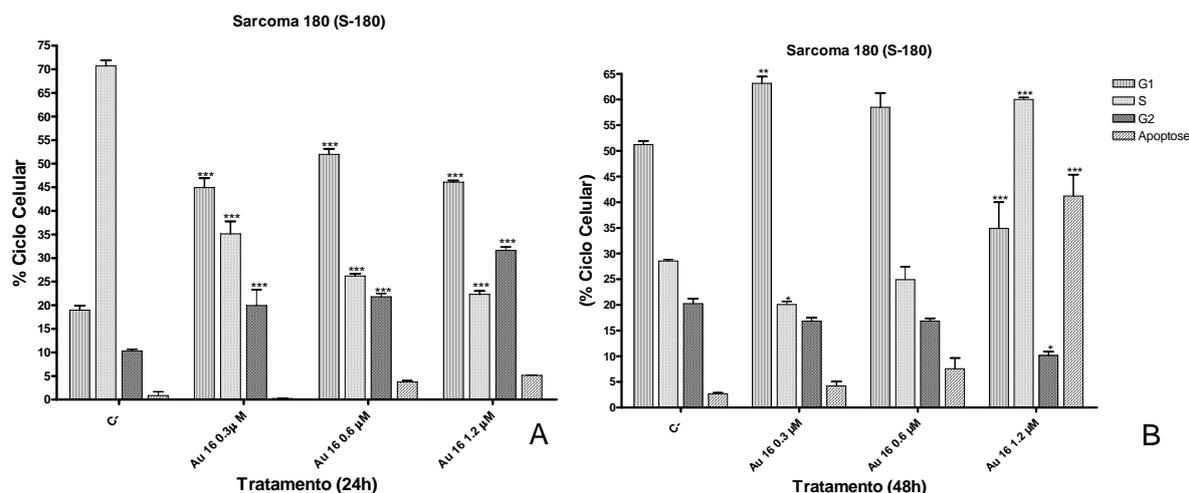


Figura 3A e 3B: Atividade do ciclo celular do composto Au16 frente a linhagem tumoral S180. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.0 Conclusão

Os resultados obtidos com Au16 demonstraram citotoxicidade, danos no DNA e morte celular por apoptose. Estes resultados, quando associados, demonstram uma relevante capacidade antitumoral por parte do composto de Rutênio Au16.

5.0. Referências Bibliográficas

ALLARDYCE, C. S., DYSON, P.J., ELLIS, D.J., SALTER, P.A., SCOPELLITI, R. 2003. Synthesis and characterisation of some water soluble Ruthenium(II)-arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties. *Journal of Organometallic Chemistry*, Volume 668, 35-42.

BARBOSA, C. E. S. Avaliação da toxicidade aguda e do efeito antitumoral do cis-tetraaminoxalatorutênio(III) sobre o sarcoma 180 em camundongos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás / UFG. 2007.

SAVA, G; ALESSIO, E; BERGAMO, E; MESTRONI, G. *Top. Biol. Inorg. Chem.*, v.1, p.143-170, 1999.

BERGAMO, A & SAVA, G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton Transactions*, 2011.

Órgãos Financiadores – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Revisado pela Orientadora Professora Doutora Elisângela de Paula Silveira-Lacerda