

Análise citotóxica, interferência na cinética do ciclo celular e estudo do mecanismo de morte de um novo complexo de Rutênio (II).

Hellen Karine Paes PORTO¹, Paula Roberta NUNES¹, Francielli Mariana dos Santos MELLO¹, Aliny Pereira de LIMA¹, Elisângela de Paula SILVEIRA-LACERDA¹.

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

*e-mail: silveiralacerda@gmail.com

Palavras-chaves: Rutênio, citotoxicidade, ciclo celular, apoptose

1.0. INTRODUÇÃO

O câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda de controle da proliferação celular e ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases para tecidos distantes. Esta perda de controle é consequência direta de mutações em um ou mais genes que regulam o crescimento celular e a morte celular programada (PINTO & FELZENSZWALB, 2003; NUSSBAUM et al., 2008).

Sabe-se que complexos metálicos têm sido usados como agentes terapêuticos desde a antiguidade. No entanto, o reaparecimento de drogas inorgânicas iniciou-se em 1960 com o desenvolvimento e o sucesso da cisplatina como agente antitumoral (BAKHTIAR et al., 1999; KELLAND, 2007; REISNER et al., 2008). Apesar do sucesso da implementação de compostos de platina, sérios problemas são enfrentados durante a administração dessas drogas, como nefro e neurotoxicidade e resistência (KARTALOU & ESSIGMANN, 2001; JIRSOVA et al., 2006).

Em vista dos problemas relacionados com o tratamento a base de platina, outros quimioterápicos que sejam menos tóxicos ao organismo e mais eficientes são necessários. O estudo da atividade antitumoral se destaca com os complexos de rutênio, os quais têm demonstrado alta seletividade para células tumorais e baixa toxicidade sistêmica comparada a compostos de platina (II) (KOSTOVA, et al., 2006; SILVEIRA-LACERDA et al., 2009; ALLARDYCE & DYSON, 2001). O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, interação na cinética celular e mecanismo de morte de um novo composto a base de Rutênio (RuTrp).

2.0. METODOLOGIA

2.1. Cultura Celular

Para os ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens: Tumor de Ehrlich (Câncer de mama murino) e L-929 (Fibroblasto murino). Todas as linhagens celulares foram mantidas segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA).

2.2. Ensaio de Redução do MTT

As células das duas linhagens selecionadas foram plaqueadas em placas de 96 poços, e tratadas com diferentes concentrações (200 – 0,2 μ M). Ao final do período de 48 horas adicionou-se a solução de MTT, deixando em incubação por 5 horas, para metabolização do reagente. A solubilização do reagente formazan foi feita com dodecil sulfato de sódio (SDS 10%). A quantificação de densidade óptica (DO) foi medida por espectrofotômetro (Awareness Technology INE/ Stat Fax 2100).

2.3. Detecção de Apoptose e/ou Necrose por Microscopia de Fluorescência

Para o ensaio, 1×10^5 células do Tumor de Ehrlich foram plaqueadas em placas de 12 poços e tratadas com o composto RuTrp nas concentrações de 50, 20 e 10 μ M por 48 horas. Após o tempo de exposição ao tratamento, as células foram centrifugadas e resuspendidas em meio de cultura RPMI completo. A ressuspensão foi corada com fluorocromos (Hoechst 33242 e Iodeto de Propídeo) e posteriormente, foram contadas 500 células em microscópio de fluorescência (Leica DM 2000).

2.4. Análise da Cinética do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

Células tratadas e células controle mantidas em cultura líquida foram lavadas com tampão PBS com EDTA e fixadas em etanol gelado a 70%, sendo posteriormente tratadas com RNase por 30 minutos e em seguida coradas com 5 μ g/mL de solução corante de iodeto de propídeo. Após o período de incubação, a distribuição das fases do ciclo celular foi determinada através de citometria de fluxo quantitativa, utilizando o Citômetro de Fluxo FACS Callibur (Becton Dickinson®, San José, CA).

2.5. Análise Estatística

Para comparação entre os grupos tratados e controle foi utilizado ANOVA segundo um único critério e pós-teste Dunnet's (software GraphPad Prism V4). Como grau de significância de 95% ($p < 0.05$).

3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da inibição da viabilidade celular RuTrp pelo ensaio colorimétrico de redução do MTT.

O presente trabalho demonstrou que composto RuTrp inibiu a viabilidade celular do Tumor de Ehrlich pelo ensaio colorimétrico de redução do MTT, com IC_{50} estimada em $7,75\mu M$ (figura 1), em 48h de tratamento. Por outro lado, o RuTrp apresentou valor de IC_{50} para a linhagem sadia L-929 estimado em $20,28\mu M$ (figura 1), 2,6 vezes maior do que o valor de IC_{50} para o Tumor de Ehrlich, em 48h de tratamento. Lima et AL., 2010 demonstrou que o composto *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) apresenta alta seletividade e atividade citotóxica para células tumorais S180 quando comparado a Cisplatina. Além disso, Silveira-Lacerda et. AL., 2009 mostrou que o mesmo composto a base de Rutênio não apresenta citotoxicidade para células normais sanguíneas PBMC. Dados que corroboram com encontrados nesse trabalho, evidenciando o potencial citotóxico e a seletividades dos compostos a base de Rutênio.

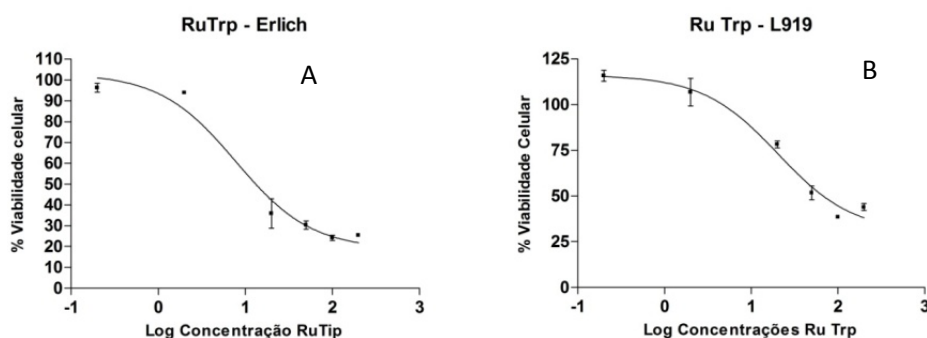


Figura 1 – Curva Concentração Resposta para determinação de IC_{50} . A) Avaliação de viabilidade celular da linhagem tumoral Ehrlich frente ao tratamento com o RuTrp (Concentrações: 200, 100, 50, 20, 2, 0,2 μM) com tempo de exposição de 48h. B) Avaliação de viabilidade celular da linhagem normal L-929 frente ao tratamento com o RuTrp (Concentrações: 200, 100, 50, 20, 2, 0,2 μM) com tempo de exposição de 48h.

3.2. Avaliação do mecanismo de morte celular do RuTrp por microscopia de fluorescência.

Como demonstrado na figura 2, o RuTrp na concentração de $20\mu M$ induz aumento do índice de apoptose ($2,35\% \pm 0,47$) e no índice de necrose ($5,8\% \pm 0,021$) quando comparado com o controle negativo ($0,8\% \pm 0,11$; $2,47 \pm 0,08$, respectivamente). Entretanto, na concentração de $50\mu M$ o composto induz morte celular por necrose ($23,7\% \pm 0,23$) no tumor de Ehrlich quando comparado como o controle negativo ($2,47 \pm 0,08$). Lima et al., 2009, demonstrou que o composto *cis*-tetraaminodichlororutênio(III) induz morte celular por apoptose na concentração de $95\mu M$ pelo teste Anexina/VFITC. A diferença pode estar na diferença no potencial redox dos compostos, o RuTrp é um composto de rutênio (II), já o *cis*-tetraaminodichlororutênio(III) é um composto de rutênio (III). Outra possível

explicação pode ser dada pela diferença entre os ligantes (não apresentados por interesses de patente).

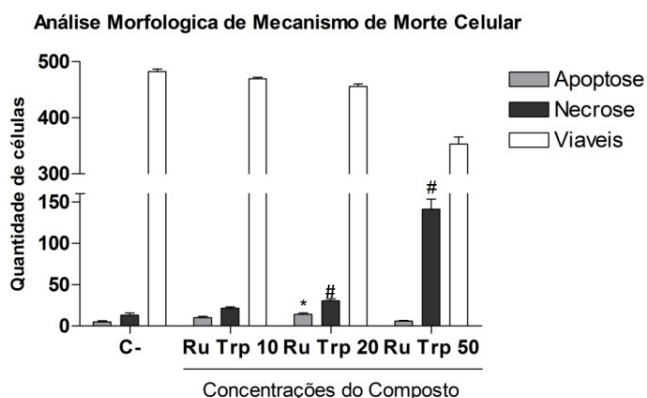


Figura 2 – Avaliação morfológica do mecanismo de morte celular da linhagem tumoral Ehrlich frente ao tratamento com o composto Ru Trp, nas concentrações de 10, 20, 50 μ M, no tempo de exposição de 48h. Dados analisados pelo teste ANOVA seguido de pós- teste Dunnet's, grau de significância * $p < 0,05$ e # $p < 0,05$.

3.3. Análise da interferência na cinética do ciclo celular do composto RuTrp.

O composto RuTrp foi testado frente ao Tumor de Ehrlich nas concentrações de 10, 20 e 50 μ M, e mostrou atividade em todas as concentrações testadas, provocando um arraste para a fase G1 do ciclo, mas acentuado na concentração de 20 μ M (fig. 3). Estudos prévios com o *cis*-tetraaminodichlororutênio(III) mostrou que o composto promoveu um arraste para a fase G1 na linhagem murina A20 (linfoma), já para a linhagem S180 (sarcoma murino) o *cis*-tetraaminodichlororutênio(III) promoveu um arraste para fase G2 (Silveira-Lacerda et al., 2009). Esses resultados sugerem que atuação dos complexos de rutênio sobre o ciclo celular depende do tipo de célula estudada.

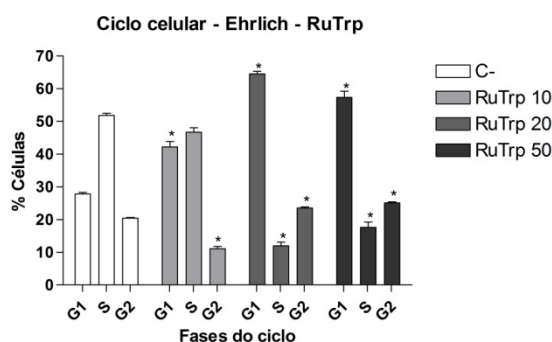


Figura 3 – Análise do ciclo celular da linhagem tumoral Ehrlich frente ao tratamento com o composto RuTrp nas concentrações de 10, 20, 50 μ M em tempo de tratamento de 48 horas. Dados analisados pelo teste ANOVA seguido de pós- teste Dunnet's, grau de significância * $p < 0,05$.

4.0. CONCLUSÃO

Neste estudo o composto RuTrp apresentou alto potencial citotóxico frente ao tumor de Ehrlich, no entanto para a linhagem normal L929, o composto apresentou

um menor potencial citotóxico. O RuTrp induz parada do ciclo celular em fase G1 e apresenta perfil de indução de morte por necrose. Embora outros estudos sejam necessários para melhor elucidação das vias de ação e efeitos do composto RuTrp.

5.0. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ALLARDYCE, C. S. & DYSON, P. J. Ruthenium in Medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Rev.** v. 45. p. 62-69. 2001.

BAKHTIAR, R. & OCHIAI, E. I. Pharmacological Applications of Inorganic Complexes. **General Pharmacology.** v. 32. p. 525-540. 1999.

BARBOSA, C. E. S. & SILVEIRA, E. P. Toxicidade aguda em dose simples do composto experimental cis-tetraaminoxalorutênio(III). **Infarma** (Brasília), v. 18, p. 12-14, 2006.

JIRSOVA, K.; MANDYS, V.; GISPEN, W. H.; BAR, P. R. Cisplatin-Induced Apoptosis in Cultures of Human Schwann Cell. **Neuroscience Letters.** v. 392. p. 22-26. 2006.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of Resistance to Cisplatin. **Mutation Research.** v. 478. p. 23-43. 2001.

KELLAND, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. **Nature.** v. 7. p. 573-584. August, 2007.

KOSTOVA, I. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. **Current Medicinal Chemistry.** v. 13, p. 1086-1107. 2006.

LIMA, A.P.; PEREIRA, F.C.; VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; RIBEIRO, A.S.B.B.; PAVANIN, L.A.; SANTOS, W.B.S.; SILVEIRA-LACERDA, E.P. The ruthenium complex *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 cells; **J. Biosci.** 35. 2010.

MENEZES, C.S.R.; COSTA, L.C.G.P.; ÁVILA, V.M.R.; FERREIRA, M.C.; UEIRA, C.V.; PAVANIN, L. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; SILVEIRA-LACERDA, E.P. Interaction between plasmid DNA and the *cis*-dichloroTetraammineRuthenium (III) chloride . **Chemico-Biological Interactions** 167, 116- 124. 2007.

NUSSBAUM, R.L.; MCINEES, R.R.; WILLARD, H.F. **Genética Médica.** 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 525 p.

PINTO, L.F.R; FELZENSZWALB, I. Genética do Câncer. *In*: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.** 1ª Ed. Canoas: Ulbra. 2003. p 247-279.

REISNER, E.; ARION, V.B.; KEPPLER, B.K.; POMBEIRO, A.J.L. Electron-Transferred Activated Metal-Based anticancer drugs. **Inorganica Chimica Acta.** v. 361. p. 1569-1583. 2008.
SILVEIRA-LACERDA, E. P, VILANOVA-COSTA C.A.S.T.; HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L.A.;

GOULART, L.R.; HOMSI-BRANDENBURGO, M. I.; SANTOS, W.B.; SOARES, A. M.; NOMIZO, A. The Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro)tetrammineruthenium(III) Chloride Presents Selective Cytotoxicity Against Murine B Cell Lymphoma (A-20), Murine Ascitic Sarcoma 180 (S-180), Human Breast Adenocarcinoma (SK-BR-3), and Human T Cell Leukemia (Jurkat) Tumor Cell Lines. **Biol Trace Elem Res.** 2009.

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