

4.03.99 - Farmácia

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DE UM COMPLEXO TRIAZENIDO DE COBRE(II) FRENTE A LINHAGEM TUMORAL MCF-7

Tacieli F. da Rosa^{1*}, Marissa B. Serafin², Máisa K. Tizotti³, Julien Wergutz⁴, Altevira R. Viana⁵; Luciana M.F. Krause⁶, Manfredo Hörner⁷

1. * Autora. Farmacêutica, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria
2. Farmacêutica, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria
3. Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria
4. Estudante de Biomedicina, Centro Universitário Franciscano
5. Biomédico, Mestrando em Ciências da Saúde e da Vida pelo Centro Universitário Franciscano
6. Bacharel em Ciências Biológicas, Doutora em Ciências Naturais pela Universidade Ludwig Maximilian de Munique, Alemanha, Professora adjunta da área da saúde e do Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida do Centro Universitário Franciscano
7. Bacharel em Química Industrial, Doutor em Química Inorgânica pela Universität Tuebingen (Eberhard-Karls, Professor titular da área de química inorgânica da Universidade Federal de Santa Maria (Orientador).

Resumo:

O câncer é definido como um conjunto distinto de doenças que caracterizam-se pelo crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. Um dos problemas encontrados no tratamento de neoplasias é o surgimento da resistência aos medicamentos antitumorais. Assim, a comunidade científica tem visado o desenvolvimento de moléculas antitumorais inovadoras.

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade citotóxica de um complexo triazeno de cobre(II), frente a uma linhagem celular de câncer de mama MCF-7. A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio MTT utilizando como controle a cisplatina, um medicamento antineoplásico em uso clínico.

Verificou-se que o complexo apresentou um perfil citotóxico superior, cerca de 11 vezes maior que o medicamento controle. Salienta-se a importância desses resultados uma vez que a linhagem celular tumoral testada caracteriza-se pela alta habilidade de formar metástases.

Autorização legal: Para a elaboração desta pesquisa não foi necessária a autorização legal do Comitê de Ética.

Palavras-chave: Resistência a medicamentos; Ensaio de seleção de medicamentos antitumorais; neoplasias da mama.

Apoio financeiro: Trabalho apoiado pelo programa PIBIC-CNPq - EDITAL CNPQ NO14-2013 UNIVERSAL PROCESSO NO 485262-2013-4.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFSM.

Introdução:

O câncer é definido como um conjunto distinto de mais de 100 doenças que caracterizam-se pelo crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), foram relatados 8,2 milhões de óbitos relacionados a doenças neoplásicas no mundo no ano de 2012, sendo esperados para o ano 2025 cerca de 20 milhões de novos casos e 11,4 milhões de óbitos [1].

Entre os tipos de câncer mais incidentes no mundo, encontra-se o de mama, apresentando a maior incidência e a maior mortalidade na população feminina, representando aproximadamente 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres [2]. Embora tenham sido realizados progressos consideráveis desde o diagnóstico até o tratamento do câncer [3], a eficácia da maioria dos agentes quimioterapêuticos convencionais (por exemplo, medicamentos anticancerígenos baseados em platina) é limitada devido a efeitos colaterais sérios e fenômeno de resistência [4]. Tal processo interfere na eficácia clínica dos agentes quimioterápicos e desfavorece o prognóstico dos pacientes.

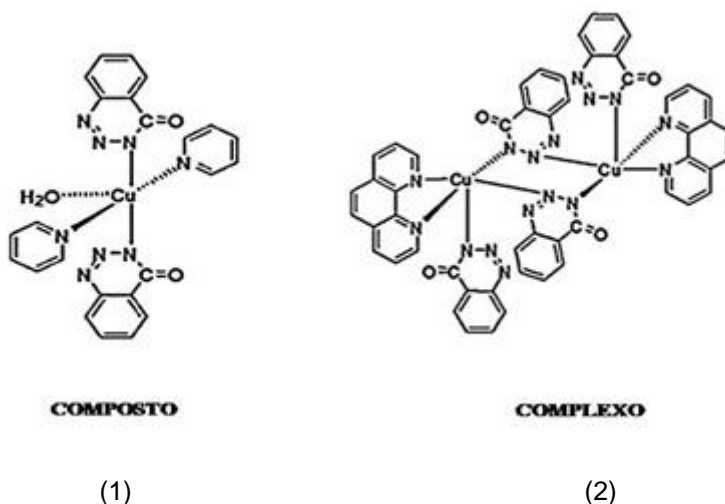
Diante deste quadro, a comunidade científica tem visado o desenvolvimento de moléculas antitumorais inovadoras, havendo um grande interesse por complexos contendo metais de transição em sua estrutura, destacando-se os complexos de cobre (II), em virtude das promissoras propriedades biológicas apresentadas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade citotóxica de um complexo triazenido de cobre(II), frente a uma linhagem celular de câncer de mama, MCF-7.

Metodologia:

Todos os reagentes e solventes foram de grau analítico e utilizados como recebidos, sem purificação adicional. Para os ensaios da atividade biológica, obteve-se água ultrapura estéril (18,2 MΩ) por purificação, através do sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore®), bem como por autoclave.

O composto triazeno e o complexo triazenido de cobre(II) foram sintetizados e caracterizados no Núcleo de Investigação de Triazeno e Complexos (NITriCo) da UFSM, sendo estes denominados: 1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona (1) e *Bis*{[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)-κN²](fenantrolina-κN¹,N¹⁰)(μ₂-[1,2,3-benzotriazenido-4-ona]-κN²,N³)}cobre(II) (2), sendo representados pelas moléculas abaixo:



A linhagem celular tumoral MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) foi obtida a partir de Banco Celular do Rio de Janeiro (RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, EUA), suplementadas com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS, Cultilab, Brasil) e 1% (v/v) de solução antimicótica antibiótica (Sigma-Aldrich, EUA). Todas as culturas foram mantidas a 37 °C numa atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

A citotoxicidade foi investigada frente a linhagem celular tumoral MCF-7 por meio do ensaio MTT. Este é um método colorimétrico que tem como objetivo quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, resultando na formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas. Os metabólitos primários envolvidos do ciclo de Krebs, NADH₂, NADPH e Succinato são os principais envolvidos nesta reação, em que a atividade metabólica da célula é dependente do número de células e está diretamente relacionada com a quantidade de MTT metabolizada, sendo a quantificação realizada por absorvância em espectrofotômetro [5].

Utilizou-se como controle a cisplatina, um medicamento antineoplásico em uso clínico. A Cl₅₀ (concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular) foi determinada por análise de regressão não-linear usando GraphPad Prism software (versão 5.0).

Resultados e Discussão:

As propriedades citotóxicas do composto e do complexo frente a linhagem celular MCF-7 foram investigadas pelo ensaio MTT. Os resultados (em termos de valores de Cl₅₀) foram comparados com os do fármaco anticancerígeno baseado em metal cisplatina (controle) em condições experimentais idênticas.

Através desta técnica pode-se observar que o composto apresentou Cl₅₀ >100 μM, o complexo Cl₅₀ = 6,16 μM e a cisplatina Cl₅₀ = 73,55 μM. Notavelmente, quando comparamos a citotoxicidade do complexo com o medicamento controle, verificou-se que este apresentou um perfil citotóxico superior, cerca de 11 vezes melhor. Esses resultados estão de acordo com outros estudos em que os complexos dinucleares de Cu(II) com ligantes auxiliares fenantrolina foram muito mais citotóxicos do que a cisplatina em relação a linhagem celulares tumorais [6].

Em geral, os complexos dinucleares de Cu(II) contendo diimina podem apresentar propriedades farmacológicas melhoradas, provavelmente devido à sinergia entre dois centros metálicos e os sistemas de anel plano. Nos últimos anos, vários estudos revelaram os promissores efeitos anticancerígenos de complexos de ligantes mistos com 1,10-fen ou quelatos de diimina relacionados. Tais achados foram atribuídos a uma maior hidrofobicidade e planaridade desses complexos, que facilitam sua permeação através da camada lipídica da membrana celular, permitindo sua interação com o DNA e outros constituintes celulares [6, 7]. Os complexos contendo Cu(II) preferencialmente se coordenam a doadores de nitrogênio e oxigênio em proteínas e no DNA [8] e realizam a quebra da fita dupla do DNA maior nas células cancerígenas do que nas não cancerígenas,

explicando sua seletividade [9,10].

Conclusões:

O complexo de Cu(II) e composto foram testados quanto a propriedades citotóxicas em células tumorais. A avaliação da atividade citotóxica demonstra que o complexo de Cu(II) exibe citotoxicidade melhorada na linhagem tumoral testada, com valor de CI_{50} marcadamente inferiores aos da Cisplatina. De acordo com os resultados encontrados, o complexo de Cu(II) torna-se um candidato interessante para desenvolvimento posterior como potencial medicamento à base de metal para aplicações antitumorais. Salienta-se novamente a importância desses resultados uma vez que a linhagem celular tumoral testada caracteriza-se pela alta habilidade de formar metástases.

Referências bibliográficas

- [1] (a) B. W. Stewart and C. P. Wild, *World Cancer Report 2014*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2014; (b) J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman and F. Bray, *Int. J. Cancer* 136 (2015) E359-E386; (c) R. L. Siegel, K. D. Miller and A. Jemal, *CA Cancer J. Clin.* 65 (2015) 5-29.
- [2] INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_ma/ma/conceito_magnitude>. Acesso em: 5 abr 2017.
- [3] (a) B. A. Chabner and T. G. Roberts, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 65-72; (b) B. Tran, J. E. Dancey, S. Kamel-Reid, J. D. McPherson, P. L. Bedard, A. M. K. Brown, T. Zhang, P. Shaw, N. Onetto, L. Stein, T. J. Hudson, B. G. Neel and L. L. Siu, *J. Clin. Oncol.* 30 (2012) 647-660; (c) B. Al-Lazikani, U. Banerji and P. Workman, *Nature Biotech.* 30 (2012) 679-692; (d) M. X. Sliwkowski and I. Mellman, *Science* 341 (2013) 1192-1198; (e) S. Gross, R. Rahal, N. Stransky, C. Lengauer and K. P. Hoeflich, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 780-1789.
- [4] (a) C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D. B. and P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer* 13 (2013) 714-726; (b) C. A. Rabik and M. E. Dolan, *Cancer Treat. Rev.* 33 (2007) 9-23; (c) S. Dasari and P. B. Tchounwou, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364-378.
- [5] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63.
- [6] (a) C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato and C. Santini, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 9 (2009) 185-211; (b) F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei and C. Santini, *Med. Res. Rev.* 30 (2010) 708-749; (c) L. Ruiz-Azuara and M. E. Bravo-Gómez, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 3606-3615; (d) C. Duncan, A. R. White, *Metallomics* 4 (2012) 127-138.
- [7] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato and C. Marzano, *Chem. Rev.* 114 (2014) 815-862.
- [8] Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ (2008) Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* 4: 176-185.
- [9] Blackman RK, Cheung-Ong K, Gebbia M, Proia DA, He S, et al. (2012) Mitochondrial electron transport is the cellular target of the oncology drug elesclomol. *PLoS One* 7: e29798.
- [10] Kirshner JR, He S, Balasubramanyam V, Kepros J, Yang CY, et al. (2008) Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Mol Cancer Ther* 7: 2319-2327.