

*AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE POR COMPOSTOS DE VANÁDIO (Me₄N)₆[V₁₅O₃₆(Cl)]
E Na₃VO₄ EM CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16F10)*

*Fernanda Pielak¹, Fernando N.C. Navarro², Sandro Germano³, Kaohana Postal⁴,
Giovana G. Nunes⁵, Jaísa F. Soares⁶, Daniela F. Maluf⁷*

RESUMO

O melanoma é um dos tipos de câncer mais perigosos, se inicia nas células produtoras de melanina, denominadas melanócitos e pode ocorrer não só na pele, mas nos olhos, trato gastrointestinal, membrana mucosa, genital e orelhas. A sua gravidade está diretamente relacionada à sua alta capacidade de realizar metástase, invadindo qualquer órgão. Portanto é um câncer com uma elevada porcentagem de letalidade, embora seja observado com menor frequência na população em comparação com outros tipos de câncer. Estudos tem demonstrado que compostos de agregados metálicos contendo o metal de transição vanádio podem ter ação de citotóxica em linhagens tumorais, sem que hajam efeitos adversos significativos. Para avaliar a atividade biológica dos compostos de vanádio, (Me₄N)₆[V₁₅O₃₆(Cl)] (V15) e Na₃VO₄, foi utilizada a linhagem de células de melanoma murino B16F10. Foram testados dois métodos para avaliação da viabilidade celular: o método do cristal violeta e método de azul de tripan. Os resultados obtidos em intervalos de 24 e 48 horas pelo método de cristal violeta e método de exclusão por azul de tripan demonstraram que o Na₃VO₄ apresentou um efeito estimulador do crescimento da célula tumoral. Já o composto V15 não apresentou citotoxicidade para a célula tumoral desta linhagem.

Palavras-chave: Melanoma. Vanádio. Citotoxicidade

ABSTRACT

Melanoma is one of the most dangerous cancers, begins in the melanin-producing cells, called melanocytes and can occur not only in the skin, but in the eyes, gastrointestinal tract, mucous membrane, genitals and ears. Its severity is directly related to its ability to perform high metastasis, breaking into any organ. This is a cancer with a high percentage of lethality, although it is observed with much less frequency in the population compared to other types of cancer. Studies have shown that compounds of metal clusters containing transition metal vanadium may have cytotoxic action in tumor lines without significant adverse effects. To assess the biological activity of vanadium compounds, V15 and Na₃VO₄, in this work it was used the murine melanoma cell line B16F10. It were tested two methods for evaluation of cell viability: the method of Violet Crystal and Trypan Blue method. The results obtained at intervals of 24 and 48 hours by Crystal Violet method and method of exclusion for trypan blue demonstrated that the compound Na₃VO₄ presents a stimulating effect of tumor cell growth. The compound showed no cytotoxicity of V15 for this tumor cell line.

Keywords: Melanoma. Vanadium. Cytotoxicity.

¹Acadêmica de Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Acadêmico de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

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

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

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é um dos tipos de câncer com pior prognóstico e de elevada malignidade. Ele se desenvolve inicialmente nas células responsáveis pela pigmentação da pele, denominadas melanócitos. Apesar de sua incidência ser relativamente baixa, se comparado a outros tipos de câncer de pele, a sua gravidade está diretamente relacionada à sua alta capacidade de realizar metástase, processo em que são enviadas células tumorais para outros órgãos, podendo comprometer até mesmo o cérebro. O melanoma pode ocorrer em diversas áreas do corpo, como a própria pele, olhos, orelhas, trato gastrointestinal e membrana mucosa e genital. Ele ocorre com mais frequência em pessoas de pele clara de fototipo I ou II, podendo ocorrer em áreas da pele que não sofreram exposição solar, embora esta seja um dos fatores de risco para a doença. O tratamento para o melanoma maligno atualmente é cirúrgico (KIELER, *et al.*, 1965).

O metal de transição vanádio está amplamente distribuído no ambiente e apresenta diversos efeitos biológicos e fisiológicos no corpo humano. Ele também se tornou cada vez mais importante para o desenvolvimento e crescimento de alguns organismos, como um dos microelementos alimentares. (MA *et al.*, 2014).

Compostos contendo vanádio tem mostrado um grande potencial como inibidores de tumores induzidos quimicamente em animais de teste e de culturas celulares *in vitro*, sendo eficiente, por exemplo, no tratamento de leucemia, adenocarcinoma de mama, pulmão, mama, do ovário, testicular, renal, gastrointestinal, tumores de Ehrlich em fuzileiros navais, carcinoma de nasofaringe em humanos. (MALUF *et al.*, 2011; SUMRRA & CHOCHAN, 2012; RAJA *et al.*, 2012).

Esta atividade antitumoral é influenciada pelo processo redox. Algumas das atividades biológicas exibidas pelo vanádio são devido à formação de complexos peroxo-vanadatos, que são inibidores irreversíveis da maioria das tirosina-fosfatases. Esta inibição, por sua vez pode levar à ativação de proteínas quinase, o que resulta em uma expressão modulada de múltiplos genes, alguns dos quais estão envolvidos na regulação da sobrevivência e proliferação de células cancerosas (EVANGELOU, 2002; STRIANESE *et al.*, 2013).

Complexos de vanádio também podem suprimir o crescimento e propagação de tumores existentes através da inibição de tumor, proliferação celular, indução de apoptose, limitando a invasão e potencial metastático das células neoplásicas. Apoptoses, incluindo apoptoses induzidas por vanádio é um processo celular importante e complexo, envolvendo um alto número de caminhos metabólicos, expresso através da regulação de várias proteínas. Compostos de vanádio podem exibir propriedades antitumorais e carcinogênicas, dependendo do modelo de pesquisa utilizado. Por exemplo, foi documentado que vanádio ou substâncias contendo vanádio inibem a apoptose dependente de p53, enquanto elas também ajudam as células com p53 funcional a entrar na fase S (NOVOTNEY & KOMBIAN, 2014; KORBERCKI *et al.*, 2012; DASH *et al.*, 2014).

Um estudo realizado com meta e ortovanadato de sódio, NaVO_3 e Na_3VO_4 respectivamente, demonstrou capacidade de prevenir o câncer causado por agentes alquilantes, tais como 7,12

dimetilbenzantraceno (DMBA) e dimetilnitrosamina (DMN) (BISHAYEE *et al*, 2000).

Nos seres humanos, embora existam estudos clínicos sobre a absorção e toxicidade de vanádio, os poucos relatórios disponíveis até o momento revelaram nenhum ou mínimo efeito adverso, este último rapidamente revertido com a conclusão do tratamento. A atividade antitumoral em conjunto com a baixa toxicidade em seres humanos, sugerem o vanádio como potencial agente antineoplásico (BISHAYEE *et al*. 2010; STRIANESE *et al*, 2013).

Estudos *in vitro* da atividade citotóxica do polioxovanadato de valência mista V15 (Figura 1) ainda não foram realizados, porém sabe-se que este composto apresentou atividade protetora do DNA plasmidial de bactéria *Escherichia coli* (NUNES *et al.*, 2012).

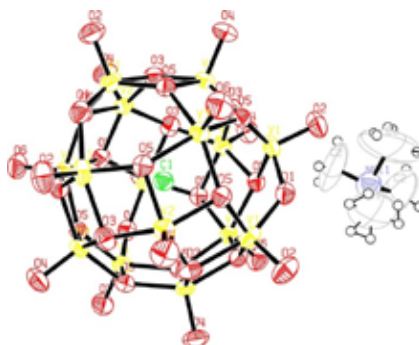


Figura 1- Estrutura do composto $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$ obtida por difratometria de raio X de monocristal
Fonte: Nunes et al, 2012

O objetivo do presente trabalho é avaliar a citotoxicidade dos compostos de vanádio, $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$ (V15) e Na_3VO_4 , em linhagem de células de melanoma murino B16F10.

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 L100A, 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 $\mu\text{g/mL}$ (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), DM SO 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 $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$ e Na_3VO_4

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: V15 (0,02 mM, 0,2 mM, 2 mM, 4 mM, 10 mM e 20 mM) e Na_3VO_4 (0,2 mM, 2 mM, 20 mM e 200 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 V15 e Na_3VO_4 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 $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$ e Na_3VO_4 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

Na leitura em 24 horas a viabilidade foi de 85% (0,2 mM), 82% (2 mM), 171% (20 mM) e 200% (200 mM). Na leitura em 48 horas a viabilidade foi de 77% (0,2 mM), 84% (2 mM), 155% (20 mM), 222% (200mM), quando comparadas com o controle. Ambas as leituras tiveram uma pequena queda de viabilidade nas menores concentrações, seguida de um aumento grande da viabilidade nas maiores concentrações.

Os resultados obtidos pelo método do cristal violeta foram semelhantes nos dois intervalos de leitura, 24 e 48 horas (Figura 2) demonstrando que o Na_3VO_4 apresenta um efeito estimulador do crescimento da célula tumoral. Também foram concordantes com os resultados obtidos pelo método do azul de tripan. Tal achado, pode ser atribuído ao íon vanadato do Na_3VO_4 , por atuar de forma semelhante ao íon fosfato no metabolismo celular, estimulando dessa maneira o crescimento celular.

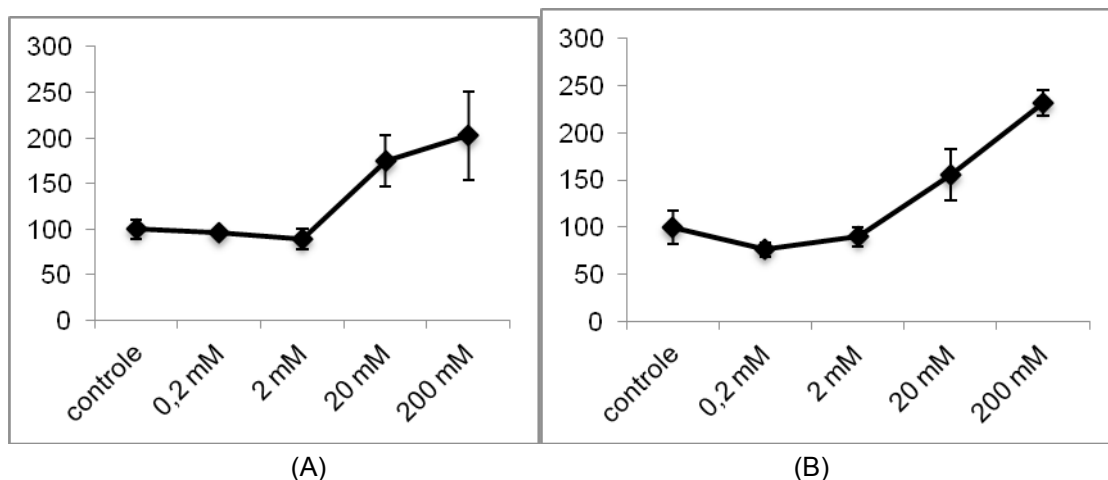


Figura 2- Gráfico de viabilidade celular do Na_3VO_4 pelo método do cristal violeta com leituras em 24 horas (A) e 48 horas (B).

O composto $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$ não apresentou citotoxicidade para a célula tumoral e ainda na concentração de 20 mM o composto pareceu estimular o crescimento celular (Figura 3). A viabilidade celular no intervalo de 24 horas foi de 111% (0,2 mM), 95% (2 mM), 122% (4 mM), 133% (10 mM), 266% (20 mM). Em 48 horas a viabilidade foi de 107% (0,2 mM), 115% (2 mM), 120% (4 mM), 138% (10 mM), 215% (20 mM).

Esse aumento de absorvância observado na maior concentração está relacionado à cor do composto e à formação de cristais observados em microscópio, já que pelo método do azul de tripan, tais resultados não se confirmaram e o composto não alterou o crescimento celular de forma diferente que ao do controle.

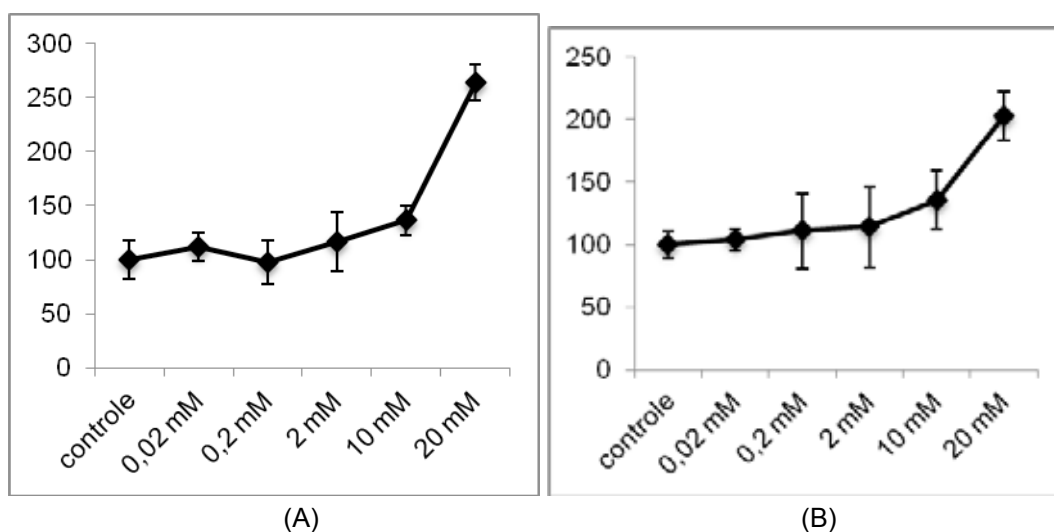


Figura 3.-Gráfico de viabilidade celular do $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$ pelo método do cristal violeta com leituras em 24 horas (A) e 48 horas (B).

CONCLUSÃO

O Método do azul de tripan corroborou com os resultados obtidos pelo método do cristal violeta para ambos os compostos, exceto o composto V15 na concentração de 20 mM onde foi observada a presença de cristais. Nesta concentração pelo método de azul de tripan, não houve estímulo do crescimento celular, mas a manutenção da viabilidade próxima ao controle.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BISHAYEE, A.; OINAM, S.; BASU, M.; CHATTERJEE, M. *Breast Cancer Res. Treat.* 63: 133–145, 2000.
- DASH, S. P.; ALOK K. PANDA, B. SAGARIKA P., DINDA, R.; BISWAS, A. TIEKINK, E.R.T; PATIL, Y.P.; NETHAJI,M.; KAMINSKY, W.; MUKHOPADHYAYF, S. BHUTIAF, S.K. Syntheses and structural investigation of some alkali metal ion-mediated LVVO₂- (L₂- = tridentate ONO ligands) species: DNA binding, photoinduced DNA cleavage and cytotoxic activities, *Dalton Trans.* 43, 2014.
- EVANGELOU A.M. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 42:249–265, 2002.
- KIELER J, GRAMEK A, NISSEN NI. Studies on the anti-neoplastic effects of vanadium salts. *Acta Chir Scand* 343(suppl):154-64, 1965.
- KOBERCKI J., BARANOWSKA- BOSIACKA I., GUTOWSKA J., CHULUBEK D. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochim Pol* 59,195-200, 2012.
- MA, Y.W.; XU, Z.; WANG, D.; ZHAO, B.; PAN, H.; WANG, J.; XU, W.; ZHAO, X.; PAN, S.; LIU, L.; DAI, W.; JIANG, H. Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in an orthotopic model in vivo, *Cancer Letters* 351108-116, 2014.
- 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.
- NOVOTNEY L., KOMBIAN B.S. Vanadium: possible use in cancer chemoprevention and therapy. *J. Cancer Research updates*, 3, 97-102. 2014.
- 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.
- RAJA D.S., BHUVANESH NATTAMAI S.P., NATARAJAN K. *Inorg Chim Acta* 385:81–93, 2012.
- STRIANESE, M.; BASILE, A.; MAZZONE, A.; MORELLO, S.; TURCO, M.C.; PELLECHIA, C. Therapeutic Potential of a Pyridoxal-Based Vanadium(IV)Complex Showing Selective Cytotoxicity for Cancer Versus Healthy Cells, *J. Cell. Physiol.* 228: 2202–2209, 2013.
- SUMRRA S.H., CHOCHAN Z.H. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 98:53–61, 2012.