



## **Citotoxicidade e Morfologia Celular do $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$ em Cultura de Células de Melanoma (B16f10)**

*Letícia Emy M. Pedroso<sup>1</sup>, Maelly Fernandes<sup>2</sup>, Yasmine M. Pupo<sup>3</sup>, Mauricio P. Franco<sup>4</sup>, Kahoana Postal<sup>5</sup>, Giovana g. Nunes<sup>6</sup>, Jaísa F. Soares<sup>7</sup>, Daniela F. Maluf<sup>8</sup>*

### **Resumo**

O melanoma é um tipo de câncer que origina-se nos melanócitos, células produtoras de melanina na pele, ocorrendo não só na pele mas em mucosas, trato gastrointestinal, olhos, orelhas e genital. Esta doença possui alta capacidade de metástase, mostrando-se agressiva, e seus tratamentos mais convencionais utilizados na atualidade também demonstram agressividade em células saudáveis do paciente, tal fato motiva pesquisas com outras substâncias para que haja uma melhoria no tratamento destes pacientes e melhor qualidade de vida durante o tratamento. Estudos anteriores relatam a ação citotóxica de compostos que contêm vanádio em células tumorais. Neste trabalho foi realizado ensaios de citotoxicidade do composto  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$  em células de melanoma murino B16-F10 através de testes de viabilidade celular com o método cristal violeta. Este trabalho revelou as características citotóxicas do composto  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$ , indicando uma potencial ação antitumoral deste polioxovanadato em linhagem de células de melanoma B16-F10.

**Palavras-chave:** Melanoma. Vanádio. Citotoxicidade.

### **Abstract**

Melanoma is a type of cancer that originates in melanocytes, melanin-producing cells in the skin, occurring not only in the skin but in mucous membranes, gastrointestinal tract, eyes, ears and genitalia. This disease has high ability to metastasize, showing aggressive, and the more conventional treatments used today also demonstrate aggressiveness in healthy cells, this fact motivates research with other substances for which there is an improvement in the treatment of these patients and better quality of life during treatment. Previous studies have reported the cytotoxic action of compounds containing vanadium in tumor cells. This work was conducted tests of cytotoxicity of the compound  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$  in murine melanoma cells B16-F10 through cell viability tests with Crystal Violet method. This work revealed the characteristics of cytotoxic compound  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$ , indicating a potential antitumor action of this polioxovanadate in melanoma cell line B16-F10.

**Keywords:** Melanoma. Vanadium. Cytotoxicity.

### **1 Introdução**

O vanádio puro é um metal flexível, dúctil e brilhante sendo considerado o 22º elemento mais abundante na crosta terrestre, está presente na crosta terrestre em concentrações de cerca de 0,015 g/kg, presente em combustíveis fósseis (petróleo, carvão) e em alguns campos petrolíferos.

1 Acadêmica de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR.

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

3 Doutora em Dentística Restauradora. Professora Adjunta da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

4 Mestrando(a) do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

5 Mestrando(a) do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

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

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

8 Doutora em Ciências Farmacêuticas, Professora adjunta do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná e Professora adjunta do curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.



O vanádio está presente também nos animais, sendo que os níveis teciduais na maioria dos vertebrados são muito baixos (CROSS et al., 1991, MUKHERJEE et al., 2004).

Na célula animal, o íon vanadato pode afetar processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas, regular muitas atividades de enzimas e participar na geração de radicais livres. A fosforilação de proteínas pelas quinases e a desfosforilação pelas fosfatases são reações chaves envolvidas na regulação do metabolismo celular, proliferação e diferenciação. O íon vanadato inibe a atividade de fosfotirosina fosfatases e estimula tirosina quinases, levando a um acúmulo de fosfotirosinas em várias proteínas celulares (NRIAGU, 1998; GOLDWASER et al., 2000a).

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).

Sua atividade antitumoral se dá pelo processo redox, o vanádio forma complexos peroxo-vanadatos que inibem a maioria das tirosinas-quinases, levando à ativação de proteínas quinases, resultando na expressão de múltiplos genes, que estão envolvidos na regulação e na proliferação de células cancerosas.

## 1.1 Melanoma

É uma doença resultante de mutações seriadas em genes que estão diretamente ligados à mecanismos de proliferação celular, apoptose, angiogênese e expressão de moléculas de adesão. Existem evidências de que há uma relação de pré-disposição genética para o desenvolvimento da doença, já que 10% dos portadores de melanoma possuem histórico familiar da doença (CULP et al, 2006)

A doença tem origem nos melanocitos, células produtoras de melanina que determinam a cor da pele. A quantidade de melanócitos varia conforme a região anatômica. Estímulos ambientais como a radiação ultravioleta podem alterar a demanda proliferativa dessas células, podendo haver alterações neoplásicas, tornando essas células malignas, ocasionando o melanoma (NAKAMURA et al, 2012).

## 1.2 Cultivo celular e células B16F10

O cultivo celular nos permite estudar fenômenos inacessíveis em tecidos intactos, observar e manipular o comportamento e função de uma população isolada de células.

Modelos animais embora sejam por definição uma aproximação da realidade, são muito úteis em uma ampla variedade de estudos dentre os quais se incluem mutações gênicas, interações proteína-proteína, sensibilidade a compostos farmacológicos, imunoterapia e os processos de invasão de metástases, dentre outros (CULP et al., 2006; TALMADGE et al., 2007).



A linhagem de melanoma murino B16 e suas sublinhagens são muito utilizadas para pesquisa e observação do crescimento tumoral por apresentarem alta tumogenicidade, porém a linhagem B16 parece ser menos invasiva que suas sublinhagens, e a habilidade de formar metástases aumenta segundo a ordem: B16F0, B16F1 até B16F10 (POSTE et al., 1982; ZHAO et al., 2001; NAKAMURA et al., 2002).

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Ensaio de citotoxicidade com o composto $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$ pelo método cristal violeta

A garrafa de cultivo contendo células B16-F10 foi tripsinizada, ressuspensando as células em meio completo contendo 10 mL de RPMI, 20% de soro fetal bovino e 100mg/ml de antibiótico penicilina/estreptomicina. Esse meio completo contendo as células foi submetido ao processo de centrifugação, e após descartar o sobrenadante as células foram ressuspensadas em 1ml de meio completo para serem quantificadas. O total de células viáveis foram contadas na câmara de Neubauer, através do método azul de tripan. Com base na contagem, foi preparada uma suspensão de células contendo em média  $0,5 \times 10^5$  células/mL.

A suspensão foi distribuída em uma placa de 96 poços, tendo em média 3000 células em cada poço, e incubada a 37°C em atmosfera de 5% de  $CO_2$  por 24 horas. Após a adesão, o meio completo foi aspirado e as células foram tratadas em concentrações crescentes do composto  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$  (0,1 mM; 0,01 mM; 0,001 mM; 0,0001 mM) em triplicatas, além de células tratadas somente com o meio de cultura (controle) e foram incubadas novamente, por 24 horas, à 37°C na estufa de  $CO_2$ .

Após esse período, o meio foi aspirado e a placa foi lavada com solução tampão fosfato, e feito o processo de fixação das células em metanol. Após a fixação das células, foi aplicada a solução cristal violeta 0,2% durante 3 minutos, e removido o excesso de corante da solução lavando a placa novamente com solução tampão fosfato. Em seguida foi acrescentado solução citrato de sódio 0,05M. Foi medida a absorbância em leitor de microplaca, em um comprimento de onda de 540 nm.

### 2.2 Análise de morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

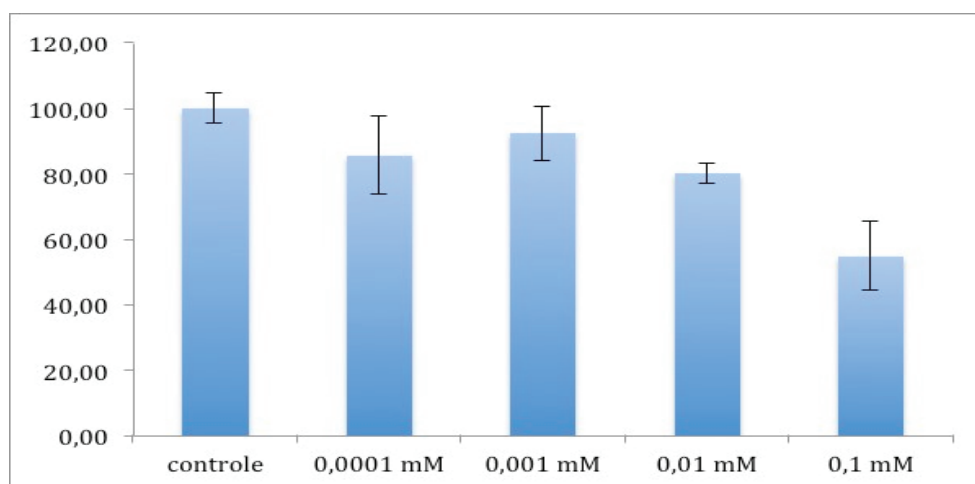
As células cultivadas e tratadas nas lamínulas da placa de 06 poços foram submetidas a procedimento de fixação com glutaraldeído e desidratação em concentrações crescentes de etanol, em seguida a placa foi enviada para a Universidade Estadual de Ponta Grossa onde, após submetida à metalização, as lamínulas com as células foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura em microscópio Shimadzu, Kyoto, Japão.

## 3 Resultados e Discussão

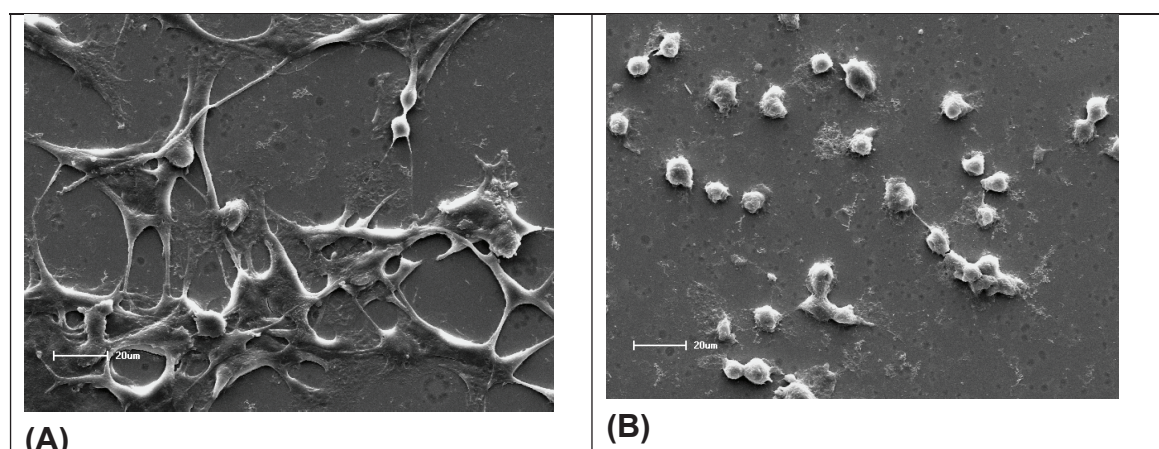
O método cristal violeta cora o núcleo de células vivas, sendo assim é utilizado para avaliar a viabilidade celular. Conforme a leitura feita em 24 horas do composto  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$ , pelo método cristal violeta, foi observado uma ação citotóxica significativa sobre a linhagem B16F10

que foi utilizada em nosso estudo, mostrando um decaimento na viabilidade da célula conforme o aumento da concentração do composto  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$ .

Este resultado pode ser associado à resultados de estudos anteriores com outros oxovanadatos e outras linhagens celulares tais como SH-SY5Y e SK-N-SH (células de neuroblastoma humano).



**FIGURA 1:** Gráfico de viabilidade celular do  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$



**FIGURA 2:** Micrografias de MEV x 500 das células B16F10 representadas em: (A) células tratadas somente com meio de cultivo e (B) células tratadas com  $C_4H_{38}N_3O_{36}V_{10}Ni$  em meio de cultivo

Os resultados da análise por Microscopia Eletrônica de Varredura demonstraram as diferenças de morfologia entre as células dos grupos tratados com (A) meio de cultivo e (B) solução de  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$  a 0,1 mM em meio de cultivo. As células de melanoma B16F10 do grupo controle (A) exibem morfologia dendrítica com prolongamentos citoplasmáticos enquanto que, quando tratadas com o polioxovanadato  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$  (B) as células tumorais apresentaram formato arredondado não dendrítico sugestivo de estágio de morte celular.



## Conclusão

Este trabalho revelou as características citotóxicas do composto  $C_4H_{42}N_4O_{37}V_{10}Cu$ , indicando uma potencial ação antitumoral deste polioxovanadato em linhagem de células de melanoma B16-F10.

## Referências

PIELAK F.; NAVARRO F.N. C; GERMANO S.; POSTAL K.; NUNES G.G.; SOARES J. F.;F. MALUF D.F. Avaliação da citotoxicidade por compostos de vanádio ( $Me_4N_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$ ) e  $Na_3VO_4$  em cultura de células de melanoma murino (B16F10), 2015.

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.

NAVARRO F.N. C; PIELAK F.; GERMANO S.; POSTAL K.; NUNES G.G.; SOARES J. F.;F. MALUF D.F. Avaliação da citotoxicidade dos compostos de vanádio  $(NH_4)_7[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)] \cdot 9H_2O$  e  $VO(acac)_2$  em cultura de células de melanoma (B16F10), 2015.

SILVA C.F.N ; MELO G.P. ; BERNARDES S. S.; CECCHINI A.A. Experimental models of in vivo murine melanoma v. 15, n. 2, 2013.

CAZAROLLI L. H. Estudo da atividade de flavanóides e de complexos de vanádio na glicemia de ratos diabéticos induzidos com aloxana, 2004.

NRIAGU, J.O. (Ed). Vanadium in the Environment: part two - health effects. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. 403p. V. 31.

CULP, W.D.; NEAL, R.; MASSEY, R.; EGEVAD, L.; PISA, P.; GARLAND, D. Proteomic analysis of tumor establishment and growth in the B16-F10 mouse melanoma model. J Proteome Res., v.5, p.1332-1343, 2006.

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. Life Sci., v.70, p.791-798, 2002.

POSTE, G.; DOLL, J.; BROWN, A. E.; TZENG, J.; ZELDMAN, I. Comparison of the Metastatic Properties of B16 Melanoma Clones Isolated from Cultured Cell Lines, Subcutaneous Tumors, and Individual Lung Metastases Cancer Res., v.42, p.2770- 2778, 1982.

MENDES R. L. Morfologia e regimes de crescimento das linhagens celulares derivadas de melanoma murino B16-F10, primário e metastático, em camundongos BALB/c, 2011.

MUKHERJEE, B.; PATRA, B.; MAHAPATRA, S.; BANERJEE, P.; TIWARI, A.; CHATTERJEE, M. Vanadium: an element of atypical biological significance. Toxicology Letters, v. 150, p. 135-143, 2004.

G. CROS, I. MONGOLD, J. J. SERRANO, S. RAMANADHAM, J. H. MCNEILL, FLAMMARION MEDICINE-Sciences - Journées de Diabétologie 1991, 193-201.