

Verificação de efeito antiproliferativo de novos glicosídeos cardíacos

OLIVEIRA, G.C.¹; FERREIRA, L.G.R.¹; NEVES, L.D.R.¹; GREGO, S.L.A.²; VILLAR, J.A.F.P.²; BARBOSA, L.A.¹

RESUMO

Glicosídeos cardíacos como a digoxina e digitoxina em doses terapêuticas possuem um efeito inibitório da Na⁺/K⁺-ATPase. Novos compostos sintetizados a partir da digoxina ainda não possuem nenhuma caracterização biológica de efeitos na Na⁺/K⁺-ATPase e nem seu potencial efeito antiproliferativo em células tumorais. O objetivo do estudo foi verificar o efeito citotóxico dos novos compostos em células HeLa e RKO, correlacionando o efeito antitumoral com a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase. Foram realizados experimentos de viabilidade celular e avaliação da atividade ATPásica. Células foram tratadas nas concentrações de 150nM e 10µM com tempos de exposição de 1h e 24h. A inibição da Na⁺/K⁺-ATPase pela digoxina (150nM) foi de aproximadamente 75%. Uma inibição significativa também foi observada para DGB2, DGB3 e DGB4 nas concentrações de 150nM e 10µM. Dentre os glicosídeos testados, a DGB5 apresentou melhor efeito citotóxico. Os novos glicosídeos cardíacos testados apresentam significativos efeitos citotóxicos e inibitórios da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase.

Palavras chaves: glicosídeos cardíacos, digitálicos, câncer cervical, atividade Na⁺/K⁺-ATPase.

INTRODUÇÃO

A busca por novos compostos com ação antitumoral é uma parte importante no estudo para a cura do câncer. A Na⁺/K⁺-ATPase é uma proteína de membrana cuja principal função é atuar como regulador da homeostase iônica celular. Além disso, é um regulador do crescimento celular e da transcrição gênica. A inibição da Na⁺/K⁺-ATPase está sendo utilizada como

um possível mecanismo para inibição do crescimento tumoral.

O efeito antitumoral de digitálicos tem sido observado em diversas linhagens celulares como TK-10 (adenocarcinoma renal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), UACC-62 (melanoma maligno), e K-562 (células leucêmicas)¹. Além disso, duas culturas celulares hematológicas malignas – células T Jurkat e células B Daudi humanas – foram ambas sensíveis a digoxina e digitoxina, e entraram em apoptose quando induzidas com concentrações não-tóxicas de digitoxina². O principal efeito farmacológico conhecido da digoxina e digitoxina em doses terapêuticas é a inibição da Na⁺/K⁺-ATPase^{3,4}.

Novos compostos sintetizados a partir da digoxina ainda não possuem nenhuma caracterização biológica de efeitos na Na⁺/K⁺-ATPase e nem seu potencial efeito antiproliferativo em células tumorais. O objetivo do trabalho foi verificar o efeito citotóxico de novos compostos glicosídeos cardíacos em células de câncer de colo uterino (HeLa) e cólon intestinal retal (RKO), correlacionando o efeito antitumoral com a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células e tratamento com os glicosídeos cardíacos

As células de colo uterino (HeLa) e cólon intestinal retal (RKO) foram cultivadas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ em meio de cultura RPMI (Sigma) complementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone) em atmosfera de 5% de CO₂. Para os experimentos de proliferação celular, foram adicionadas 22,5x10⁵ células em cada garrafa de cultivo, nas quais foi possível observar uma multiplicação e aderência celular satisfatória. As células foram tratadas com digoxina a 150nM durante 24h de exposição e com os glicosídeos cardíacos DGB2, DGB3 e DGB4 nas concentrações de 150nM e 10µM. A exposição de DGB2 às células foi de 1h e 24h, e DGB3 e DGB4 foram de 24h.

¹ Universidade Federal de São João Del Rei - CCO Dona Lindu - Laboratório de Bioquímica Celular - Divinópolis-MG
– E-mail: gj_capanema@hotmail.com

² Universidade Federal de São João Del Rei - CCO Dona Lindu - Laboratório de Síntese Orgânica - Divinópolis-MG

Ensaio de viabilidade celular MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol) foi realizado como descrito por MOSMANN⁵. O ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem o MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium a cristais de formazan, de cor azul-violeta. A redução do MTT ocorre pela ação da enzima desidrogenase mitocondrial, presente somente em células viáveis. Após a solubilização dos cristais, é feita a quantificação por espectrofotometria a 550nm. A viabilidade celular foi determinada na presença dos compostos DGB2, DGB3, DGB4, DGB5, DGB6 e DGB7 em diluições seriadas, com diferentes concentrações.

Preparação das frações de membrana

Para a preparação da fração de membrana celular, retirou-se o meio de cultura contendo os digitálicos das garrafas de cultivo. As células foram lavadas três vezes com PBS e removidas das garrafas utilizando um *rubber policeman* na presença de tampão de preparação contendo Tris 0,5M (pH 6,8), Imidazol 0,5M, Sacarose 3M, SDS 20%, EDTA 0,1M, PMSF 2mM e Na₂VO₃ 1mM. Foram maceradas em *potter* por 10 vezes em gelo, sonicadas a 45% de potência por 10s em gelo e centrifugadas a 9000 rpm, a 4°C por 1h. O *pellet* foi ressuspendido em tampão de preparação e sonicado novamente a 25% de potência por 10s.

Dosagem de proteína total

As dosagens de proteína total das amostras foram determinadas pelo método descrito por HARTREE⁶, usando como padrão BSA na concentração de 0 a 120 µg/µL.

Determinação da atividade ATPásica da Na⁺/K⁺-ATPase.

A dosagem de Atividade foi realizada por adaptação do método de FISKE⁷ em que foi quantificado o fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do ATP.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados pelo GraphPadPrism 5 Demo, no qual empregou-se análise de variância (ANOVA) seguido de teste de comparação múltipla de Tukey com valor significativo de p<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Novos glicosídeos cardíacos foram testados em duas linhagens celulares: células de carcinoma do colo uterino (HeLa) e células de carcinoma de cólon intestinal retal humano (RKO). O IC₅₀ foi determinado através do ensaio de viabilidade celular MTT (Tabela 1), variando-se as concentrações aplicadas. O melhor glicosídeo que apresentou efeito citotóxico foi o DGB5 (na faixa de 0,3µM). Os compostos apresentaram maior especificidade para a célula RKO, que apresentou um melhor efeito de citotoxicidade para a maioria dos glicosídeos testados quando comparado às células HeLa.

Tabela 1. Ensaio de viabilidade celular-MTT

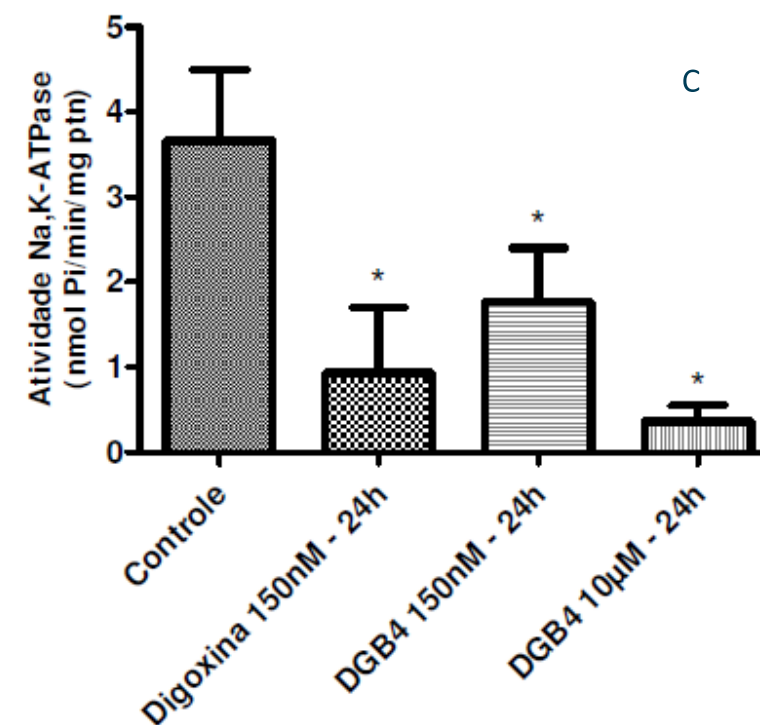
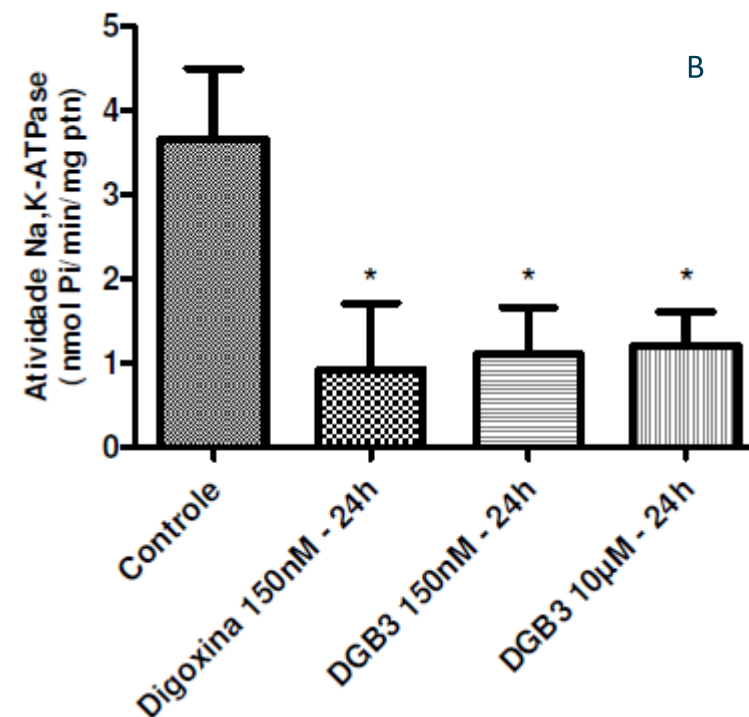
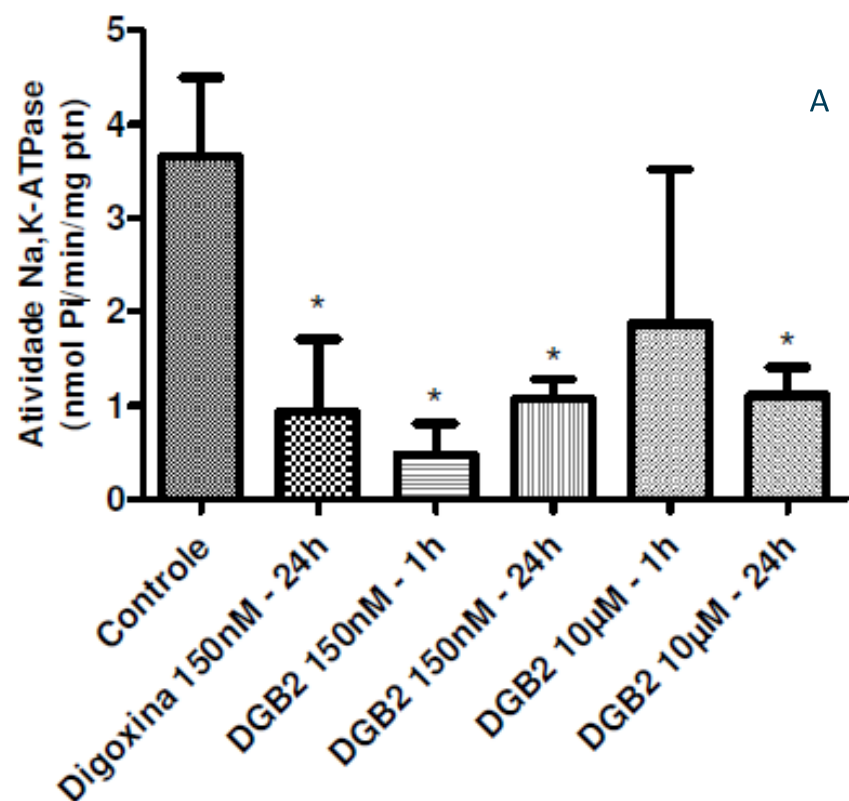
Glicosídeos cardíacos	HeLa (µM)	RKO (µM)
DGB2	61,41 ± 18,41	79,00 ± 15,32
DGB3	42,56 ± 15,14	18,99 ± 8,13
DGB4	60,89 ± 18,47	41,36 ± 9,94
DGB5	0,26 ± 0,0636	0,48 ± 0,16
DGB6	65,20 ± 8,48	42,27 ± 20,01
DGB7	40,08 ± 5,52	23,78 ± 1,13

A atividade ATPásica da Na,K-ATPase em células HeLa intactas foi determinada após o tratamento com digoxina (150nM) e DGB2, DGB3 e DGB4 nas concentrações de 150nM e 10µM. Em ambos os experimentos, a digoxina, após 24h de exposição, apresentou um efeito inibitório significativo da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase de aproximadamente 75% quando comparado ao controle. Uma inibição significativa também foi observada para a DGB2 nas concentrações de 150nM (após 1h e 24h) e 10µM (após 24h). (Figura 1A).

Após 24 horas de exposição das células HeLa à DGB3 e DGB4 nas concentrações de 150nM e 10µM, observou-se um efeito inibitório significativo da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase quando comparado ao controle (Figura 1B e 1C).

O perfil de inibição da Na⁺/K⁺-ATPase apresentado pelo tratamento utilizando a DGB3 foi similar ao perfil apresentado pela digoxina (Figura 1B). Já a DGB4 na concentração de 150nM apresentou uma menor inibição quando comparada à digoxina, enquanto que na concentração de 10µM esta inibição foi ainda maior do que a inibição apresentada pela digoxina (Figura 1C).

Figura 1. Determinação da atividade ATPásica da Na⁺/K⁺-ATPase em células HeLa intactas. N=3. (p<0,05).



CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que os novos glicosídeos cardíacos DGB2, DGB3 e DGB4 apresentam um significativo efeito inibitório na atividade da Na^+/K^+ -ATPase, sendo que a DGB3 apresentou um perfil de inibição similar ao apresentado pela digoxina. Além disso, efeitos citotóxicos também foram observados para todos os glicosídeos testados, sendo que a DGB5 apresentou o melhor IC_{50} .

REFERÊNCIAS

- (1) LOPEZ-LAZARO, M.; PASTOR, N.; AZRAK, S.S.; AYUSO, M.J.; AUSTIN, C.A.; CORTES, F. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. **J. Nat. Prod**, v. 68, p. 1642-1645, 2005.
- (2) HAUX, J.; LAM, M.; MARTHINSEN, A.B.C.; STRICHERT, T.; LUNDGREN, S. Digitoxin in nontoxic concentrations induces apoptotic cell death in Jurkat T cells in vitro. **Z Onkol/J Oncol**, v. 31, p. 14–20, 1999.
- (3) HAUX, J. Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. **Med. Hypotheses**, v. 53, p.543-548, 1999.
- (4) BAGROV, A.; SHAPIRO, J.I.; FEDORA, O.V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacol Rev**, v. 61, p. 9–38, 2009.
- (5) MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63,1983.
- (6) HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.
- (7) FISKE, C.H.; SUBBAROW Y. The colorimetric determination of phosphorous. **J Biol Chem**, v.66, p.375–400, 1925.