

¹Frunqillo, L.; ¹Anazetti, M.C.; ²Durán, N.; ^{1,3}Melo, P.S.

¹Depto. de Bioquímica, IB, UNICAMP; ²Lab. de Química Biológica, IQ, UNICAMP; ³METROCAMP, SP
e-mail: L034140@dac.unicamp.br

Desidrocrotonina – Complexos de Inclusão – Estresse Oxidativo

Introdução

Leucemogênese é um fenômeno complexo caracterizado por anomalias na proliferação e na diferenciação que resultam na inibição da maturação e na expansão clonal. A linhagem celular mielogênica leucêmica humana HL60 foi estabelecida a partir de leucócitos do sangue periférico de pacientes com leucemia promielocítica aguda. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a Desidrocrotonina (DHC), extraída da *Corton cajucara*, possui efeitos citotóxicos, através da indução de apoptose, em células HL60¹. No entanto, relatos indicam hepatotoxicidade induzida por DHC *in vivo* e citotoxicidade à hepatócitos de rato. As ciclodextrinas são aplicadas como carregadoras funcionais para controlar o perfil da taxa e/ou do tempo da liberação da droga, proporcionando aumento da eficácia terapêutica, estabilidade da droga e redução dos efeitos colaterais². Este estudo visa a análise da modulação da indução de apoptose em célula tumoral, leucemia humana HL60³ através do tratamento com DHC livre e complexada a β CD (DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD).

Material e Métodos

Cultura de Célula Leucêmica

Células da Leucemia Humana (HL60) foram mantidas em cultura em suspensão em meio RPMI 1640 suplementado com 20% SFB, 100 U/mL de Penicilina e 100 μ g/mL de Estreptomina.

As análises que seguem foram realizadas após exposição das células a DHC e complexos em ciclodextrinas (β CD, Me β CD e HP β CD) por diferentes tempos.

Viabilidade Celular - MTT

Após o tratamento, foi adicionado às células o sal MTT (5mg/mL), seguido de incubação por 3 horas. O precipitado foi lavado e solubilizado em etanol absoluto. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm.

Ação de antioxidantes e depletor de GSH

As células foram pré incubadas (1 hora) com antioxidantes - glutatona 1mM (GSH), N-acetil-cisteína 1mM (NAC) e GSH + NAC - e com depletor de GSH - dietil-maleato 100 μ M (DEM); seguido do tratamento com DHC e os complexos. Após 72 horas foi realizado o ensaio de MTT.

Swelling mitocondrial

As mitocôndrias foram isoladas de células e ressuspensas em tampão CFS. A absorbância foi medida a 520 nm em 15 min a 25°C utilizando espectrofotômetro.

Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Foi utilizado o kit BD™ MitoScreen, que consiste na aplicação do fluorocromo lipofílico catiônico, JC-1 para citometria de fluxo.

Liberação de Citocromo c

As medidas de citocromo c humano em lisados celulares foram feitas utilizando o Quantikine Cytochrome c Immunoassay (ELISA sandwich da R&D Systems, USA).

Resultados

Viabilidade celular - ação da DHC livre e complexada

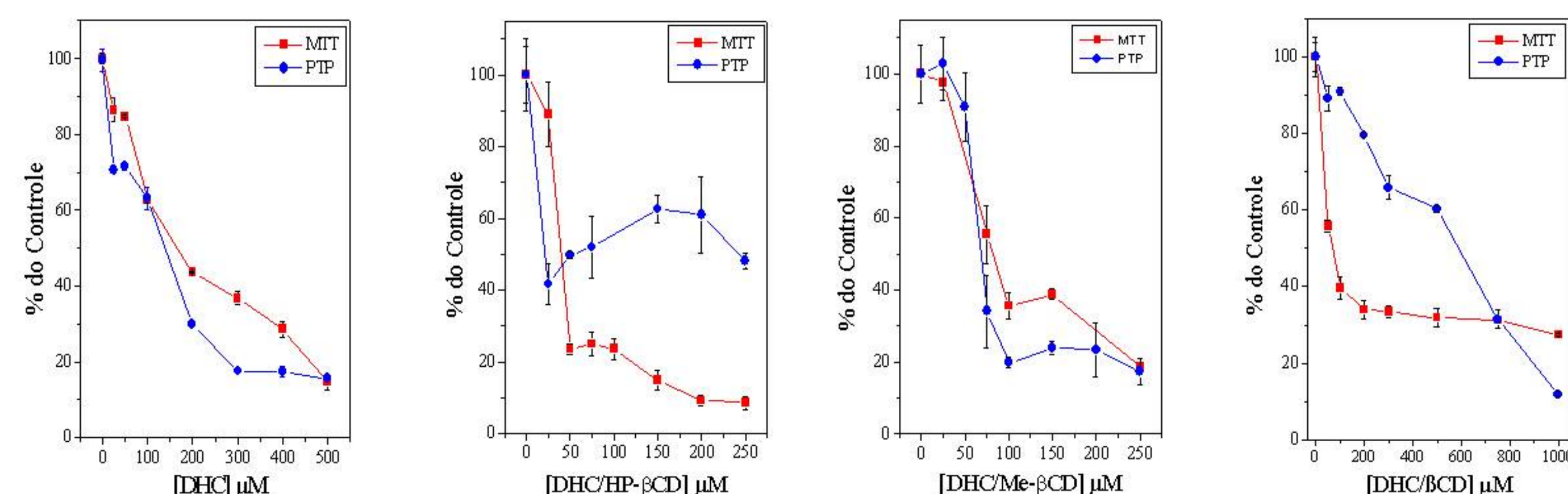


Figura 1. Viabilidade celular medida pelo ensaio de MTT. Exposição de 72 horas a DHC e complexos. Cada ponto representa a média de três experimentos realizados em triplicata (* P<0,001 em relação ao controle).

Viabilidade celular - ação dos antioxidantes

Tabela 1. Valores de IC₅₀ obtidos após pré-tratamento com antioxidantes (GSH, NAC, GSH+NAC) e seu depletor (DEM), na presença e ausência de CsA.

TRATAMENTOS	Valor de IC ₅₀ após pré-tratamento com antioxidantes e depletor de GSH (μ M)									
	s/ antioxidantes		GSH 1mM		NAC 1mM		GSH 0,5mM + NAC 0,5mM		DEM 0,5mM	
Pré-incubação por 1 h com CsA 1 μ M	s/	c/	s/	c/	s/	c/	s/	c/	s/	c/
DHC	380 ± 3,00	NE (70%)	NE	NE	665 ± 3,41	NE (73%)	NE (80%)	NE (60%)	160 ± 1,34	NE
β CD/DHC	117 ± 2,30	NE (60%)	NE (55%)	NE (70%)	380 ± 2,60	NE (50%)	NE	NE (55%)	115 ± 2,30	NE
Me β CD/DHC	585 ± 3,05	NE (76%)	NE	NE	665 ± 3,41	NE (73%)	NE (85%)	NE (65%)	168 ± 1,34	NE
HP β CD/DHC	117 ± 2,81	NE (63%)	NE (65%)	NE (76%)	400 ± 2,65	NE (55%)	NE	NE (55%)	123 ± 2,34	NE

Swelling mitocondrial

Tabela 2. Porcentagem de aumento de swelling mitocondrial em células HL60 tratadas em relação ao controle.

Tratamentos (μ M)	Tempos de Exposição (h)			
	03	06	12	24
Controle	-	-	-	-
DHC 150	36 ± 2,0	63 ± 2,5	42 ± 2,6	45 ± 3,2
DHC 250	46 ± 2,3	51 ± 3,2	55 ± 2,9	62 ± 3,4
DHC/ β CD 150	53 ± 3	52 ± 2,7	77 ± 3,2	60 ± 2,3
DHC/ β CD 250	47 ± 2,5	36 ± 3,0	83 ± 2,8	82 ± 4,2
DHC/ β CD 400	43 ± 1,9	31 ± 2,8	73 ± 3,2	84 ± 4,5
DHC/Me β CD 150	43 ± 2,1	58 ± 3,2	34 ± 1,9	92 ± 3,4
DHC/Me β CD 250	45 ± 1,5	55 ± 2,8	36 ± 3,4	73 ± 2,9
DHC/HP β CD 150	37 ± 3,2	41 ± 4,0	41 ± 2,7	76 ± 3,1
DHC/HP β CD 250	36 ± 2,3	36 ± 2,9	73 ± 3,2	60 ± 2,3

Cada valor representa a média ± S.D. de três experimentos em quatro replicatas. Os dados foram normalizados em relação ao controle (todos os resultados apresentados acima foram significativamente diferentes quando comparados ao controle, com *P<0,001).

Figura 2 continuação. 1. Controle; 2. DHC 150 μ M; 3. DHC 250 μ M; 4. β CD 250 μ M; 5. DHC/ β CD 150 μ M; 6. DHC/ β CD 250 μ M; 7. DHC/ β CD 400 μ M; 8. Me β CD 250 μ M; 9. DHC/Me β CD 150 μ M; 10. DHC/Me β CD 250 μ M; 11. DHC/Me β CD 400 μ M; 12. HP β CD 250 μ M; 13. DHC/HP β CD 150 μ M; 14. DHC/HP β CD 250 μ M; 15. DHC/HP β CD 400 μ M.

Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Tabela 3. Porcentagem de perda de $\Delta\psi_m$ em células HL60 após exposição à DHC e seus complexos de inclusão na presença e ausência de CsA (1 μ M) (*P<0,05 em relação aos controles). Cada valor representa a média ± SD de três experimentos realizados em triplicata.

Tratamentos (μ M)	Tempos de exposição (h)					
	03	06	12	24	48	72
1) Controle	5	7	10	12	8	7
2) DHC 150	16*	20*	14	30*	86*	84*
3) DHC 250	18*	19*	28*	50*	88*	85*
4) β CD 250	6	9	13	13	20*	6
5) DHC/ β CD 150	25*	17*	19*	20*	36*	42*
6) DHC/ β CD 250	21*	22*	20*	22*	51*	66*
7) DHC/ β CD 400	17*	18*	19*	23*	83*	92*
8) Me β CD 250	7	8	8	13	17	8
9) DHC/Me β CD 150	19*	22*	21*	26*	85*	85*
10) DHC/Me β CD 250	16*	21*	25*	33*	95*	89*
11) DHC/Me β CD 400	19*	22*	21*	26*	85*	85*
12) HP β CD 250	6	10	12	15	7	8
13) DHC/HP β CD 150	20*	24*	21*	26*	80*	86*
14) DHC/HP β CD 250	15*	23*	20*	42*	92*	94*
15) DHC/HP β CD 400	21*	25*	25*	55*	88*	90*

Conclusões e Perspectivas

Os resultados apresentados são referentes à células HL60, o mesmo padrão de resposta foi observado nas demais células utilizadas no desenvolvimento do projeto (U937, K562, K562 Lucena). Nossos resultados indicam que a inclusão da desidrocrotonina em ciclodextrinas aumenta o efeito citotóxico através de um mecanismo de indução de morte celular diferente, as formas complexadas se mostraram mais eficientes na indução do estresse oxidativo quando comparadas a DHC livre, provavelmente devido a interações com a membrana e a liberação sustentada.

Referências

- Anazetti, M.C.; Melo, P.M.; Durán, N. and Haun, M. (2004). Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases -2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. *Toxicology*, 25(1-2), 1-10.
- Siepmann, J.; Peppas, N.A., (Eds.), 2001. *Mathematical modelling of controlled drug delivery*. Published as *Advances in Drug Delivery Reviews*, 48, p. 250.
- Anuradha, C.D.; Kanno, S.; Hirano, S. (2001). *Free radical biology and medicine* The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. 31: 367-373.