

# MONITORAMENTO DA APOPTOSE CELULAR INDUZIDA POR PALADACICLOS NA LINHAGEM DE CÉLULAS K562 ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO UTILIZANDO-SE A TÉCNICA DE FTIR/ATR

**Karla Lenina Fiel**<sup>1</sup>; **Vivian Matsukura dos Santos**<sup>2</sup>; **Tiago Rodrigues**<sup>3</sup>; **Antonio Carlos Fávero Caires**<sup>4</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: karla\_lenina@yahoo.com.br<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Biotecnologia; e-mail: vimtsu@gmail.com.<sup>2</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: trodrigues@umc.br<sup>3</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: caires@umc.br<sup>4</sup>

**Área do Conhecimento:** Química de Organometálicos

**Palavras-chaves:** FTIR/ATR; Paladaciclos; Apoptose; Linhagem K562; Espectroscopia de Infravermelho

## INTRODUÇÃO

Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido importantes complexos paladaciclos com propriedades antitumorais. Dentre eles o complexo  $[Pd(C^2, N-S_{(-)}dmpa(dppf)]Cl$  (**SF12**) patenteado internacionalmente pela FAPESP. Este composto, hoje entrando para testes clínicos de Fase I, junto ao INCA e a FIOCRUZ, combate eficazmente vários tipos de células tumorais, incluindo a linhagem K562, responsável pela Leucemia Mielóide Crônica, uma linhagem resistente a qualquer tipo de quimioterapia [2]. O composto dispara o processo apoptótico, ou seja de morte celular programada da célula de forma específica através do rompimento de lisossomos [2]. Neste contexto, de desenvolvimento e de estudos mecanísticos de drogas antitumorais, a espectroscopia de FTIR é uma técnica vibracional que dá informações sobre a composição química de uma amostra, fornecendo uma espécie de "*impressão digital molécula (fingerprint)*" da mesma [1,3-5]. É uma técnica poderosa para o estudo de células intactas. Assim, o objetivo deste projeto foi analisar e quantificar células apoptóticas por estudos de FTIR, utilizando a técnica de Reflexão Atenuada Total (ATR). Culturas de células leucêmicas humanas da linhagem K562 foram incubadas com o paladaciclo antitumoral  $[Pd(C^2, N-S_{(-)}dmpa(dppf)]Cl$  e monitoradas quanto a indução da apoptose durante um certo tempo. Os espectros vibracionais das culturas, após os devidos tratamentos matemáticos de subtração de espectros das "amostras em branco" foram obtidos e analisados. Várias mudanças espectrais foram observadas em regiões espectrais específicas e correlacionadas por integração de áreas de bandas de absorção, em particular a região de ácidos nucleicos situada na faixa de  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  e da Amida I de proteínas em  $1599-1710\text{ cm}^{-1}$ . Por meio dos resultados adquiridos nós preconizamos que pelas características dessas células obtidas no espectro de FTIR/ATR e por correlações matemáticas adequadas entre regiões espectrais, esta técnica pode ser utilizada para o diagnóstico de células em apoptose na difícil linhagem K562. Esperamos assim dar uma importante contribuição científica nos campos de testes de eficácia de drogas antitumorais e de mecanismos de ação.

## OBJETIVOS

Demonstrar como a técnica de FTIR/ATR pode ser útil para o estudo de apoptose celular na linhagem resistente de células K562, responsável pela leucemia mielóide crônica, utilizando um composto paladacilo indutor de apoptose nessa linhagem na esperança de trazer uma importante contribuição científica no campo de estudos de eficácia de mecanismos de drogas antitumorais, diferenciando mortes celulares por necrose de mortes promovidas por apoptose.

## METODOLOGIA

Foram incubadas células leucêmicas humanas da linhagem K562 com o paladacilo antitumoral (SF12). Essas foram monitoradas quanto a indução da apoptose durante 24h pela técnica de MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]. Os espectros vibracionais de FTIR/ATR foram medidos para culturas de células em apoptose 100% viáveis, obtidas por tratamento das mesmas com uma solução 20  $\mu\text{M}$  do paladacilo. De igual forma foram medidos espectros de células tratadas com Ultrassom ou com Triton, simulando a morte por necrose das mesmas e também de células tumorais K562 normais (sem o uso de drogas), utilizadas como controle. Os espectros foram medidos em um *Espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Spectrum 100*, utilizando-se um monocristal de ZnSe 45° como elemento óptico de reflexão interna. Utilizou-se tratamentos matemáticos como a subtração espectral para se obter espectros sem interferências para cada amostra analisada e integração de áreas no modo ( $\text{A} \times \text{cm}^{-1}$ ) para as regiões de Amida I e Amida II de proteínas e para a região de ácidos nucleicos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espectros vibracionais das células tumorais K562, responsáveis pela Leucemia Mielóide Crônica, foram medidos na região de 650-4000  $\text{cm}^{-1}$  e analisados com a finalidade de se estabelecer “*fingerprints*”, para células apoptóticas, cuja morte foi induzida pelo paladacilo SF12. A simulação da morte celular por necrose foi induzida por aplicação de ultrassom e por tratamento das culturas celulares com Triton. Dessa forma, analisados os espectros vibracionais de FTIR/ATR das células tratadas com o paladacilo SF12 (apoptóticas), para células tratadas com Ultrassom ou Triton (necróticas) e para células sem nenhum tratamento (K562 normais), observamos inicialmente profundas alterações na região da AMIDA I quando comparamos as três situações. Ressaltamos que nessa região espectral situada entre (1599-1710  $\text{cm}^{-1}$ ) é que surgem os modos vibracionais normais que correspondem a estiramentos C=O acoplados às flexões (*bending*) N-H dos aminoácidos existentes nas ligações peptídicas. A forma e a intensidade das bandas de absorção existentes nessa região são influenciadas por várias estruturas secundárias de proteínas celulares, em particular os sinais atribuídos a configurações em  $\alpha$ -hélices (1645-1662  $\text{cm}^{-1}$ ), Estruturas  $\beta$ -pregueadas (1613-1637  $\text{cm}^{-1}$ ), *turns* (1662-1682  $\text{cm}^{-1}$ ) e Estruturas Randômicas (1637-1645  $\text{cm}^{-1}$ ). A região da AMIDA II (1483-1595  $\text{cm}^{-1}$ ) surge a partir dos modos normais de vibração que envolvem flexões (*bending*) C-N-H e estiramentos C-N dos peptídeos. Dito isso, na comparação espectral das três amostras celulares notamos que a parede celular da célula K562 possui uma alta contribuição de Estruturas  $\beta$ -pregueadas, pela intensa banda de absorção existente em 1637  $\text{cm}^{-1}$  e de estruturas Randômicas pela intensa banda localizada em 1620  $\text{cm}^{-1}$ . Entretanto, quando analisamos os espectros vibracionais de células em apoptose pelo efeito do paladacilo SF12 e necróticas produzidas pelo efeito do ultrassom, notamos, em ambos os casos, uma contribuição protéica bastante rica em estruturas contendo  $\alpha$ -hélices, pelo surgimento de uma nova e

intensa banda de absorção em  $1659\text{ cm}^{-1}$ . O referido modo vibracional possui uma intensidade um pouco menor nas células necróticas. Este fato mostra uma mudança tanto conformacional quanto de teor protéico dessas amostras, possivelmente pelo extravasamento de outras proteínas solúveis da célula. Embora um pouco deslocadas, tanto nas células necróticas como nas apoptóticas a banda relativa à contribuição de estruturas  $\beta$ -pregueadas continua presente nas amostras em  $1635$  e  $1638\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Observamos ainda que as células necróticas apresentam uma banda de absorção em  $1685\text{ cm}^{-1}$ , mostrando uma contribuição maior de estruturas secundárias randômicas para o processo necrótico da linhagem celular K562. Um outro fator importante é que no processo de necrose uma nova banda de absorção centrada em  $1627\text{ cm}^{-1}$  aparece como uma verdadeira impressão digital do processo, uma vez que é totalmente ausente do processo de apoptose celular. Trabalhando-se a matematicamente a relação  $\text{Área AMIDA I}/\text{Área AMIDA II}$ , operando-se as leituras do espectrômetro na forma de *Absorbância X Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )* obtivemos o valor de 0,95 u.a. para as células K562 apoptóticas e 0,91 u.a. para as células normais. Esse aumento de 0,04 u.a. sugere que várias mudanças bioquímicas e biofísicas de proteínas celulares ocorrem durante a apoptose. Nossa hipótese é que a clivagem de proteínas celulares realizadas por diversas caspases apoptóticas a modulação de atividade de chaperonas e da função do proteossoma sejam responsáveis por este efeito.

Uma outra região de importante análise para o trabalho realizado é situada entre  $900\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ . Nesta região encontramos importantes informações sobre as moléculas de DNA, RNA, carboidratos e grupos fosfatos dos ácidos nucleicos. Em  $1080\text{ cm}^{-1}$  ocorre o estiramento simétrico do grupo fosfato do fosfodiéster  $\nu_s\text{ PO}_2^-$  e em  $1240\text{ cm}^{-1}$  o correspondente estiramento assimétrico  $\nu_{\text{ass}}\text{ PO}_2^-$ . Em  $965\text{ cm}^{-1}$  temos a absorção do grupo desoxirribose do DNA. Novamente por cálculos de área nesta região pela integração dos sinais obtivemos um valor de 134,43 u.a. para as células K562 normais e de 32,05 u.a. para as células apoptóticas induzidas pelo paladaciclo SF12, indicando profundas modificações na estrutura dos ácidos nucleicos. Nas células necróticas o valor calculado foi de 392,0 u.a. Esses valores mostram que as estruturas do DNA sofrem profundas modificações, seja em estrutura primária, secundária, terciária ou quaternária, considerando-se os diferentes processos. Uma outra análise minuciosa foi feita na região entre  $1000\text{--}1140\text{ cm}^{-1}$ , uma região de ligações glicosídicas do DNA. A integração de áreas das bandas de absorção nessa região mostrou que o espectro da célula K562 normal possui 11,18 u.a., enquanto o das células em apoptose possui 45,82 u.a. Atribuímos esta ocorrência ao fato de nas células normais o DNA estar compartimentalizado e condensado na estrutura da cromatina, enquanto nas células em apoptose o mesmo está fragmentado. Na célula em necrose este valor sobe para 134 u.a., corroborando com nossa suposição, onde o mesmo encontra-se desnaturado. A razão entre  $\text{Área DNA (1000-1140 cm}^{-1})/\text{Área Amida II}$  está diretamente relacionado com o índice de apoptose celular. Esta razão no nosso caso foi de 1,2 para células necróticas, 1,3 para células normais da K562 e 1,45 para as células apoptóticas. Existem muitas controvérsias na literatura quanto ao aumento ou diminuição deste valor nos processos de apoptose, que no nosso caso foi crescente. No nosso entendimento, através dessas discussões nosso objetivo foi inteiramente cumprido e os resultados de acordo com dados da literatura para outras linhagens celulares [1,3-5].

## CONCLUSÕES

Ficou demonstrado que a técnica de FTIR/ATR pode ser útil para o estudo de apoptose celular na linhagem resistente de células K562, responsável pela leucemia mielóide crônica, uma linhagem resistente a qualquer tipo de quimioterapia. Além de demonstrar

a eficácia do paladaciclo como bom indutor de apoptose a técnica diferencia mortes celulares por necrose de mortes promovidas por apoptose com grande nitidez, apresentando um “*fingerprint*” em  $1627\text{ cm}^{-1}$  para células necróticas, além de diferenças significativas para correlações de bandas de absorção e de áreas de bandas nas regiões de Amida I e de Ácidos Nucléicos (DNA e RNA) para os dois processos de morte celular.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Andrus, P.G., *Technology in Cancer Research and Treatment*, 2006, **5**(2), 157-167

Barbosa, C. M. V.; Oliveira, C. R.; Nascimento, F. D.; Smith, M. C. M.; Fausto, D.; Soufen, M. A.; Sena, E.; Araújo, R. C.; Tersariol, I. L. S.; Bincoletto, C.; **Caires, A. C. F\***; *European Journal Of Pharmacology*, 2006, **542**, 37-47

Gasparri, F.; Muzio, M.; *Biochemical Journal* , 2003, **369**, 239-248

Liu, K. Z.; Jia, L.; Kelsey, S. M.; Newland, A. C. and Mantsch, H. H., *Apoptosis* **6**, 269-278

Zhou, J.; Wang, Z.; Sun, S.; Liu, M. and Zhang, H., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2001, **33**, 127-132

#### **AGRADECIMENTOS**

CNPq, FAEP/UMC, FAPESP- pelos suportes financeiros.