

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO DIFENIL DISSELENETO EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO

Karoline Kristina Kemmerich¹; Claudia Alves da Costa²; Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues Cunha³; Tiago Rodrigues⁴

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: kristinakemmerich@hotmail.com
2. Mestranda do Programa de Biotecnologia; e-mail: ca.liny@hotmail.com
3. Professor Associado/UFABC; e-mail: rodrigo.cunha@ufabc.edu.br
4. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: tiago.rodrigues@ufabc.edu.br

Área do conhecimento: **Metabolismo e Bioenergética**

Palavras-Chaves: Organocalcogênios; mitocôndria; morte celular; selênio; tióis.

INTRODUÇÃO

Compostos orgânicos funcionalizados com calcogênios, especialmente aqueles com selênio em sua composição, vêm recebendo crescente atenção voltada para o reconhecimento e entendimento, em nível molecular, de suas diferentes atividades biológicas. Particularmente, difenildisseleneto (DPDS) é um dos compostos mais estudados dessa classe e acredita-se que sua atividade biológica, e de outros compostos contendo selênio, possa estar associada à alteração do estado redox de tióis intracelulares (FREI *et al.*, 2007; GLASER *et al.*, 2013). No entanto, O DPDS apresentou efeito protetor sobre a peroxidação lipídica induzida por ácido quinolínico, que superestimula o sistema glutaminérgico, diminuindo assim, de forma concentração-dependente, a geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ROSSATO *et al.*, 2002; POSSER *et al.*, 2008; MEOTTI *et al.*, 2004; GHISLENIA *et al.*, 2003). Além disso, não afetou a viabilidade celular de fatias de hipocampo de rato, pelo contrário, aumentou a viabilidade dos mesmos na presença de peróxido como agente estressor (POSSER *et al.*, 2008). Suas propriedades hepatoprotetoras também foram associadas à diminuição de disfunções mitocondriais e atenuação dos danos causados por metilmercúrio em ratos (CARVALHO *et al.*, 2013; CORTE *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

Avaliar o possível efeito citotóxico de difenil disseleneto em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), explorando os mecanismos moleculares envolvidos.

METODOLOGIA

O difenil disseleneto (DPDS) foi sintetizado, purificado, caracterizado e cedido pelo Prof. Dr. Rodrigo L. O. R. Cunha (UFABC) e a solução estoque de DPDS foi preparada em DMSO (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99\%$). Para os experimentos, a concentração máxima de DMSO usada não apresentou efeito mensurável sobre os parâmetros analisados. As células HepG2 (hepatocarcinoma) foram cultivadas em meio DMEM high glucose (Sigma-Aldrich, USA) suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) inativado por calor (Gibco, South America origin), antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$) (Gibco), com pH 7.2. Para os ensaios, células (9×10^5 cells/cm²) foram incubadas com DPDS por 24h. Para o

teste de redução de MTT, adicionou-se 10µL de MTT (5mg/ml) por 4h e 100µL de SDS 10% *overnight*. A absorbância foi lida em 570nm / 620nm (BiochromAsys Expert Plus Microplate Reader, BiochromLtd., UK). No teste de exclusão do Azul de Tripán, as células foram suspensas com tripsina, centrifugadas (160xg por 10 minutos) e suspensas em 500µL de meio DMEM suplementado. Foram adicionados 20µl de suspensão celular em 20µl de Azul de Tripán 0.016% e observadas por microscopia utilizando câmera de Neubauer. A dupla marcação com anexina V-FITC/PI foi realizada suspendendo as células em 50µL de tampão Anexina (HEPES 0,1 M, NaCl 1,4 M, CaCl₂ 2,5 M) mais 5µl de solução Anexina V-FITC (BD Biosciences, EUA) e 5µl de iodeto de propídio (BD Biosciences, EUA), incubando no escuro por 20 minutos. Após adição de 300µL de tampão anexina, a emissão da fluorescência foi medida em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences), adquirindo 10.000 eventos por amostra. Para as análises gráficas e estatísticas foram usados os programas Origin 9.1 (Microcal™ Software, Inc.), Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc.) e FlowJo vX.0.7 (Ashland, EUA). Os traçados são representativos e os dados quantitativos são provenientes de no mínimo três experimentos independentes (n≥3), sendo apresentados como média ± SEM (erro padrão da média). Quando pertinente, a análise da significância estatística dos dados experimentais foi avaliada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey, considerando p<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incubação das células de hepatocarcinoma humano HepG2 com o DPDS resultou em aumento da absorbância do MTT em relação ao controle sem droga, sugestivo de estimulação da proliferação celular (Fig. 1). Visto que o resultado obtido é incomum, o DPDS foi incubado com o MTT na ausência de células e o resultado obtido foi o mesmo, indicando que trata-se de uma interferência redox da droga com o MTT. Apesar de outros estudos utilizarem esse método para avaliar viabilidade celular após incubação com DPDS (Bruggisser *et al.*, 2002), nossos resultados mostraram que esse método é inviável para avaliar a citotoxicidade de DPDS, gerando artefatos experimentais.

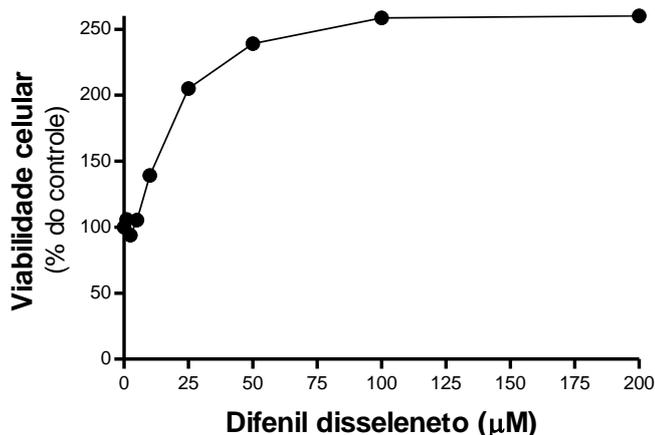


Fig. 1. Efeito do DPDS sobre a viabilidade celular: As células incubadas com o DPDS por 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ 5% mostraram efeito de estimulação da proliferação celular.

Dessa forma, a viabilidade das células HepG2 incubadas com DPDS foi avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripán. Pode se observar na Fig. 2 que o DPDS diminuiu a

viabilidade celular de forma concentração-dependente e o valor de EC_{50} de calculado foi de $25,7 \pm 0,1 \mu M$. Estudos prévios já sugeriram a citotoxicidade do DPDS em linhagens tumorais (POSSER *et al.*, 2011; NEDEL *et al.*, 2012; DÍAZ *et al.*, 2017) e também em não-tumorais (BUENO *et al.*, 2013).

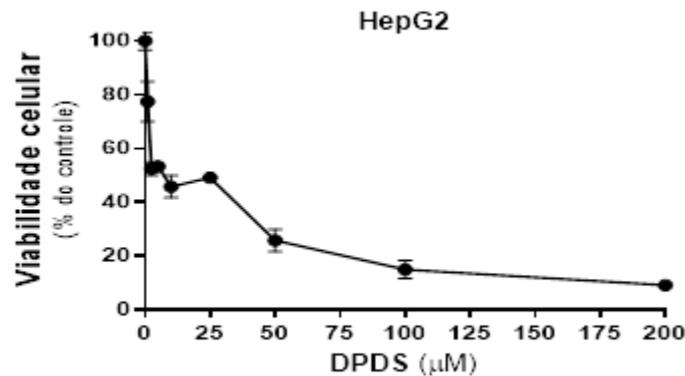


Fig. 2. Efeito do DPDS sobre a viabilidade de células HepG2 avaliada pelo método de exclusão do Azul de Tripán. As células HepG2 foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ 5%, com diferentes concentrações de DPDS. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão do Azul de Tripán. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes.

Para um melhor entendimento da citotoxicidade do DPDS em células HepG2, foi realizado um experimento de citometria de fluxo com dupla marcação fluorescente usando anexina V-FITC e iodeto de propideo (PI), além do uso dos dados de SSC (*side scatter*) e FSC (*forward scatter*) da citometria em células não marcadas para definir a população de células mortas e viáveis. Como pode ser observado na Fig. 3A, a adição de DPDS diminuiu a população de células viáveis, corroborando a Fig. 2. No ensaio com marcação por anexina V-FITC/PI, o DPDS induziu um aumento da população duplamente marcada com anexina V-FITC/PI (Fig. 3B), que é sugestivo de apoptose tardia, que também foi relatada em estudos prévios com esse composto (Posser *et al.*, 2011; Nedel *et al.*, 2012).

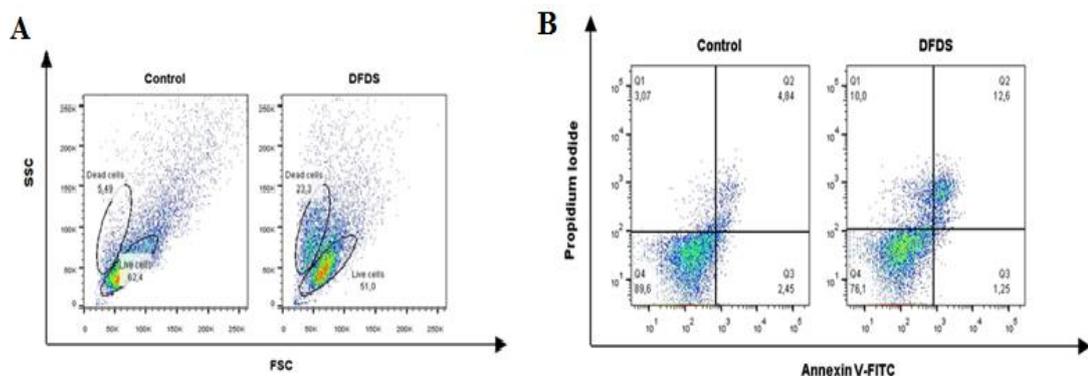


Fig. 3. Caracterização da morte celular: As células HepG2 foram incubadas com DPDS por 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ 5% (A) Aumento de granularidade e diminuição do tamanho das células incubadas com DPDS ao comparar ao controle. (B) Dupla marcação de células incubadas com DPDS sugerindo apoptose tardia.

CONCLUSÃO

O difenildisseleneto induziu apoptose em células de hepatocarcinoma humano HepG2. A morte foi decorrente da permeabilização da membrana mitocondrial e esse efeito foi associado com a oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas mitocondriais por efeito direto do composto. Dessa forma, esses resultados auxiliam a esclarecer os mecanismos de citotoxicidade de difenildisseleneto, e apontam para o potencial antitumoral deste composto.

REFERÊNCIAS

BUENO, D.C.; MEINERZ, D.F.; ALLEBRANDT, J.; WACZUK, E.P.; SANTOS, D.B.; MARIANO, D.O.; ROCHA, J.B.T. Cytotoxicity e genotoxicity evaluation of organochalcogens in human leucocytes: a comparative study between ebselen, diphenyl diselenide, e diphenyl ditelluride. **Biomed Res Int**, v. 1, p. 1-6, 2013.

BRUGGISSER, R.; DAENIKEN, K.V.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens e antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Med**, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002.

DÍAZ, M.; GONZÁLEZ, R.; PLANO, D.; PALOP, J.A.; SANMARTÍN, C.; ENCÍO, I. A diphenyl-diselenide derivative induces autophagy via JNK in HTB-54 lung cancer cells. **J Cell Mol Med**, v. 22, n. 1, p. 289-301, 2017.

FREI, G. M.; LEBENTHAL, I.; ALBECK, M.; ALBECK, A.; SREDNI, B. Neutral and positively charged thiols synergize the effect of the immunomodulator AS101 as a growth inhibitor of Jukart cells, by increasing its uptake. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 5, p. 712-722, 2007.

GLASER, V.; MORITZ, B.; SCHMITZ, A.; DAFRÉ, A.L.; NAZARI, E.M.; MÜLLER, Y.M.R.; FEKSA, L.; STRALIOTTOA, M.R.; BEM, A.F.; FARINA, M.; ROCHA, J.B.T.; LATINI, A. Protective effects of diphenyl diselenide in a mouse model of brain toxicity. **ChemBiol Interact**, v. 206, n. 1, p. 18-26, 2013.

IBUKI, Y.; TOYOOKA, T. Nanoparticle uptake measured by flow cytometry. **Methods Mol Biol**, v. 926, n. 1, p. 157-166, 2012.

NEDEL, F.; CAMPOS, V.F.; ALVES, D.; MCBRIDE, A.J.; DELLAGOSTIN, O.A.; COLLARES, T.; SAVEGNAGO, L.; SEIXAS, F.K. Substituted diaryldiselenides: cytotoxic e apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells. **Life Sci**, v. 91, n. 9-10, p. 345-352, 2012.

POSSER, T.; de PAULA, M.T.; FRANCO, J.L.; LEAL, R.B.; da ROCHA, J.B. Diphenyl diselenide induces apoptotic cell death e modulates ERK1/2 phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Arch Toxicol**, v. 85, n. 6, p. 645-651, 2011.

SILVA, M.H.; ROSA, E.J.F.; CARVALHO, N.R.; DOBRACHINSKI, F.; ROCHA, J.B.T.; MAURIZ, J.L.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SOARES, F.A.A. Acute Brain Damage Induced by Acetaminophen in Mice: Effect of Diphenyl Diselenide on Oxidative Stress e Mitochondrial Dysfunction. **Neurotox Res.**, v. 21, n. 3, p. 334-344, 2012.