AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ANTIMÔNIO SB_2O_3 EM LINHAGENS CELULARES

Gabriel Elias Bueno, Ana Caroline Silva, Michele Dietrich Moura Costa. e-mail: mi_dietrich@hotmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Área: Morfologia/ Subárea: Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: Antimônio, Cultivo Celular, Morte Celular.

Resumo

O Antimônio (Sb) pertencente à família 15 da tabela periódica, é naturalmente encontrado na crosta terrestre e possui diversas aplicações industriais e farmacológicas. Na indústria é utilizado na fabricação de retardantes de chamas e resinas plásticas tal como o cloreto polivinílico conhecido popularmente como PVC, e em catalisadores para produção de garrafas PET (tetraftalato de polietileno). Já sua utilização farmacológica é destinada ao tratamento de lesões cutâneas da doença parasitária Leishomaniose. Embora haja o aumento da sua disponibilidade em consequência de sua utilização, pouco se sabe os possíveis efeitos citotóxicos desse composto e seu mecanismo de ação. Com intuito de avaliar o potencial citotóxico do Sb, as linhagens celulares de Adenocarcinoma Humano (HeLa), Feocromocitoma de rato (PC12) e Célula Embrionária de Rim Humano (HEK- 293T) foram expostas a 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM, 16 µM, 32 µM, 64 µM e 128 µM de trióxido de Antimônio (Sb_2O_3) por 24 e 48 horas. Após a exposição às concentrações e tempos adequados, a morfologia e a viabilidade destas células foi analisada e observou que a linhagem HeLa apresentou maior suscetibilidade ao Sb_2O_3.

Introdução

O Antimônio é um elemento químico de símbolo Sb que dispõe de um número atômico 51, pertencente à família 15 da tabela periódica. Esse metal é naturalmente encontrado na crosta terrestre. Sua forma estável apresenta uma coloração cinza prateada do tipo lustrosa. Apresenta ainda, uma baixa condutibilidade elétrica e térmica (ANDERSON, 2012).

O trióxido de antimônio (Sb_2O_3) é o composto de antimônio (Sb) mais produzido atualmente. O metal de antimônio é usado para a produção de chumbo antimonial, que é um importante produto para a fundição secundária de chumbo (ANDERSON, 2012). Na indústria é utilizado na fabricação de materiais retardantes de chama e resinas plásticas, como popularmente conhecido, o PVC (cloreto polivinílico) e em catalisadores para produção de garrafas PET (tereftalato de polietileno). Seu uso na indústria e na mineração tem levado ao aumento da disponibilidade do Sb no Ambiente (BUTTERMAN; CARLIN, 2004).

Como farmáco, o Sb é o principal componente dos medicamentos utilizados no tratamento de todas as formas de Leishomaniose (RUGANI; QUARESMA, 2018). Apesar de sua utilização como fármaco e sua disponibilidade na natureza, pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação celular (HALDAR, 2011).

Com intuito de avaliar a citotoxicidade do Sb, diferentes linhagens celulares, Adenocarcionoma Humano (HeLa), Feocromocitoma de rato (PC12) e Célula

Embrionária de Rim Humano (HEK- 293) foram expostas a diferentes concentrações de Sb_2O_3 durante 24 e 48 horas.

Material e Métodos

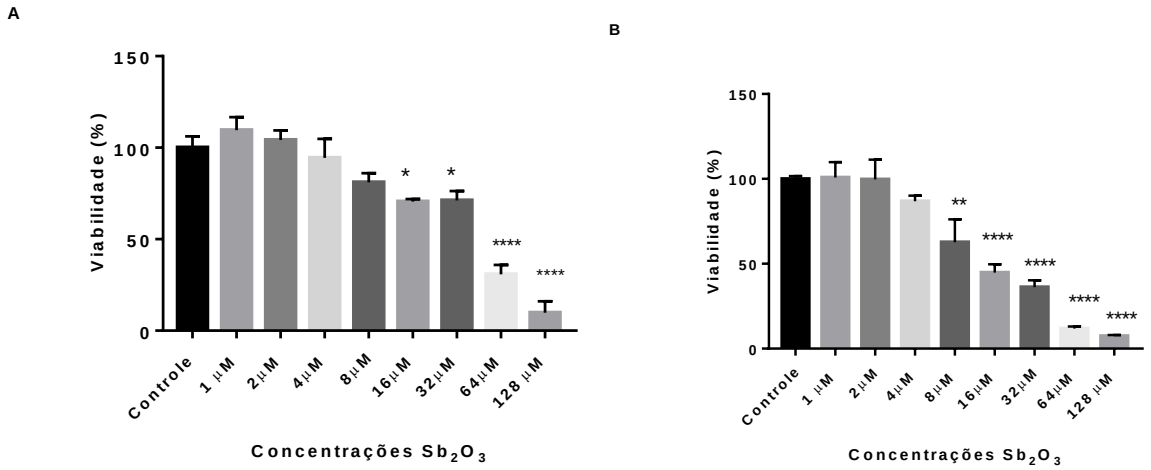
- *Cultivo Celular.* As linhagens celulares de HeLa, PC12 e HEK- 293T foram cultivadas em Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com 10 % de Soro Fetal Bovino e mantidas em incubadora de CO_2 a 37ºC. A manutenção destas células em cultivo foi realizado por repiques celulares 2 a 3 vezes na semana.
- *Solução de Sb_2O_3 compatível com aplicação in vitro.* A diluição do trióxido de antimônio (Sb_2O_3) para obtenção de uma solução compatível para a utilização em cultivo foi feita em ácido clorídrico (HCL) fumegante a 37%, adquirindo uma solução de concentração final de 0,25M de Sb_2O_3.
- *Concentrações de Sb_2O_3*. As concentrações de *Sb_2O_3* usadas no tratamento das linhagens celulares foram de 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM, 16 µM, 32 µM, 64 µM e 128 µM. Concentrações estas, preparadas a partir da solução estoque de Sb_2O_3 (0.25M).
- *Plaqueamento celular e tratamento com Sb_2O_3.* As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços: HeLa (15.000 células/poço), HEK-293T (20.000 células/poço) e PC12 (20.000 células/poço). Após 24 h do plaqueamento, as células foram tratadas com as concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µM de Sb_2O_3 obtidas por meio de diluição seriada, e incubadas por 24hr e 48hr na incubadora de CO_2, a 37ºC.
- *Análise da viabilidade celular pelo teste colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}*. As linhagens tratadas com as diferentes concentrações de Sb_3O_2 e incubadas por 24h e 48h. Após o tempo de exposição ao Sb_2O_3, foram adicionados a cada poço 50 µL de reagente MTT (0,5 mg/ml) e as células incubadas por 4 horas a 37 °C em estufa a 5% CO_2. Após a remoção do reagente, adicionou -se 100 µL de sulfóxido de dimetil (DMSO) em cada poço para solubilização dos cristais de formazan, que são preciptados de cor arroxeada formados a partir da redução do reagente amarelo MTT pelas células viáveis. A absorbância, foi medida em espectrofotômetro de microplacas Biotek Elx 800 em comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados três experimentos independentes para cada linhagem celular, com quatro replicatas por concentração usada de trióxido de antimônio.
- *Análise estatística*. A análise estatística utilizada para obtenção dos resultados foi pelo software estatístico GraphPad Prism (versão 7.00 para Windows, San Diego, Califórnia, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de distribuição normal de Shapiro-Wilk e posteriormente analisados por ANOVA de uma via e pós teste de Turkey, com nível de significância de $p<0,05\%$. Todos os testes foram realizados utilizando o software. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle (as células tratadas com o veículo da solução de antimônio: $p<0,05$). O Cálculo da Viabilidade Celular (%) foi realizado segundo a equação: V (%)= (Absorbância da célula *100/ média do Veículo).

Resultados e Discussão

- *Linhagem Celular HeLa:* Esta linhagem celular apresentou morte nas concentrações de 16 µM, 32 µM, 64 µM e 128 µM de Sb_2O_3 por 24 horas. Conforme mostra o Gráfico 1A. Em 48 horas a morte celular ocorreu nas concentrações de 8 µM,16 µM, 32 µM, 64 µM e 128 µM de Sb_2O_3 (Gráfico 1B).

ISSN 1676-0093

GRÁFICO 1. Viabilidade Celular da linhagem HeLa tratada com diferentes concentrações de Sb_2O_3 por 24h (A) e 48h (B).

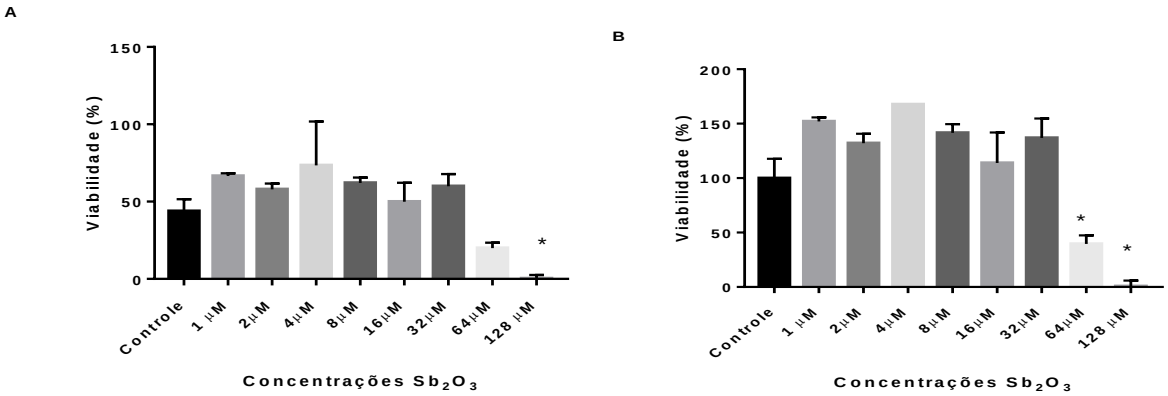


NOTA: A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, após a exposição das células ao Sb_2O_3, nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µM. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de três ensaios independentes, com quatro replicatas por concentração de Sb_2O_3. Os valores foram obtidos por análise ANOVA uma via, seguida pelo teste de TURKEY ($p<0,05$). O símbolo * representa diferença em relação ao controle ($p<0,05$).

-Linhagem Celular HEK – 293T: Quando os ensaios foram realizados com a linhagem HEK-293T, utilizando o método do MTT, foi observado que após o tempo de incubação com este reagente os cristais de formazan encontravam-se no sobrenadante da solução. Isso impossibilitou a leitura em espectrofotômetro de microplacas. O experimento foi então repetido com as mesmas concentrações de Sb_2O_3 por 24 e 48 horas sem a remoção do MTT, evitando assim que as células contendo os cristais fossem removidas, e mesmo assim não houve sucesso na leitura. No terceiro experimento, o MTT foi diluído com PBSG (PBS com Glucose) suplementado com 1 mM de Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$) e 1 mM de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), componentes utilizados pelas células para adesão ao substrato. Não houve êxito na leitura. Durante a análise da morfologia celular da linhagem nas placas por um microscópio invertido, pode se verificar a resistência da linhagem ao Sb_2O_3. Apesar da análise morfológica da linhagem, os resultados dos experimentos realizados, devido ás limitações, são inconclusíveis.

- *Linhagem Celular PC12:* Apresentou morte celular apenas nas concentrações de 64 µM e 128 µM de Sb_2O_3. Esta linhagem mostrou-se resistente ao tratamento em ambos períodos de tempo testados (Gráfico 2A e 2B).

GRÁFICO 2. Viabilidade Celular da linhagem PC12 tratada com diferentes concentrações de Sb_2O_3 por 24h (A) e 48h (B).



NOTA: A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, após a exposição das células ao Sb_2O_3, nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µM. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de três ensaios independentes, com quatro replicatas por concentração de Sb_2O_3. Os valores foram obtidos por análise ANOVA uma via, seguida pelo teste de TURKEY ($p<0,05$). O símbolo * representa diferença em relação ao controle ($p<0,05$).

Conclusão/ões

Através dos resultados pode-se concluir que a linhagem celular HeLa apresentou maior suscetibilidade ao tratamento aplicado, pois apresentou morte celular nas concentrações 8, 16, 32, 64 e 128 µM. Já a linhagem celular PC12 mostrou resistência ao Sb_2O_3, apresentando morte celular apenas nas concentrações de 64 µM e 128 µM. Com a linhagem celular de HEK-293T, os resultados são inconclusíveis.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pelo apoio financeiro, através da concessão de bolsa de Iniciação Científica. A minha orientadora Professora Doutora Michele Dietrich Moura Costa pelas orientações na realização desta pesquisa e aos meus colegas de Laboratório.

Referências

ANDERSON, C. G. The metallurgy of antimony. **Chemie der Erde.** v. 72, n. 4, p. 3-8 Jul. 2012.

BUTTERMAN, W. C.; CARLIN, J. F. Jr. Mineral Commodity Profiles Antimony **U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR U.S. GEOLOGICAL SURVEY** 2004.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Mol Biol Int** v. 2011 n. 2001, 2011

RUGANI, N. J.; QUARESMA, P. F. Intraspecies susceptibility of Leishomania (Viannia) braziliensis to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v.108, p. 1170 – 1180, 2018.