

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós- Graduação em Análises Clínicas

**EFEITO CITOTÓXICO DO SISTEMA HRP/INDÓIS EM
CÉLULAS McCOY *IN VITRO***

Débora Helena Pereira

ARARAQUARA

2008

DÉBORA HELENA PEREIRA

**EFEITO CITOTÓXICO DO SISTEMA HRP/INDÓIS EM
CÉLULAS McCOY *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
para obtenção do grau de MESTRE em Análises Clínicas
Área de Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

Co-orientador: Prof. Dr. Valdecir Ximenes

Araraquara-SP

2008

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carvalho

(Membro titular)

Prof^a. Dr^a. Eliana Aparecida Varanda

(Membro titular)

07 de Outubro de 2008

A busca fundamental

Então Jesus falou aos seus discípulos: “Por isso eu lhes digo: não fiquem preocupados com a vida, com o que comer; nem com o corpo, com o que vestir. Pois a vida vale mais do que a comida, e o corpo mais do que a roupa. Observem os corvos: eles não semeiam, nem colhem, não possuem celeiros ou armazéns. E, no entanto, Deus os alimenta. Vocês valem muito mais do que as aves. Quem de vocês pode crescer um centímetro à custa de se preocupar com isso?

Portanto, se vocês não podem nem sequer fazer a menor coisa, por que se inquietam com o resto? Observem como os lírios crescem: eles não fiam, nem tecem. Porém, eu digo a vocês que nem mesmo o rei Salomão, em toda a sua glória, jamais se vestiu como um deles. Se Deus veste assim a erva do campo, que hoje existe e amanhã é queimada no forno, quanto mais ele fará por vocês, gente de pouca fé! Quanto a vocês, não fiquem procurando o que vão comer e o que vão beber. Não fiquem inquietos. O Pai bem sabe que vocês têm necessidade dessas coisas. Portanto, busquem o Reino dele, e Deus dará a vocês essas coisas em acréscimo. Façam bolsas que não envelhecem, um tesouro que não perde o seu valor no céu: lá o ladrão não chega, nem a traça rói.

De fato, onde está o seu tesouro, aí estará também o seu coração.”

(Lucas 12, 22-34)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela força e pela graça de ter conseguido chegar até aqui com Suas bênçãos ilimitadas e acreditando ser essa conquista mais um sonho de amor que realizas em minha vida.

Aos meus pais Luiz e Maria, pelo imenso amor e compreensão, pela alegria e apoio e pelo exemplo que me concederam, concedem e concederão sempre pois são as pessoas mais maravilhosas que alguém pode ter como pais. Vocês são motivo de orgulho e exemplos de vida pra mim, sou fã incondicional de vocês.

Sem vocês jamais teria chegado até aqui. Amo vocês.

Ao meu namorado, Fabrício, meu amor, minha paixão, meu amigo, companheiro, que vibra, sofre e chora se for preciso, agradeço por ter atravessado essa difícil batalha ao meu lado, sempre me dando forças para continuar, me trazendo de volta à paz... sem você não teria conseguido. Te amo “*..I give my hand to you with all my heart; I can't wait to live my life with you,I can't wait to start; You and I will never be apart; My dreams came true because of you...*” (Shania Twain).

Agradeço à Lú (Luciana) minha irmã, que mesmo nas correrias e nos desencontros de nossos horários, sei que torceu e vibrou ao me ver chegar até aqui obrigada “... *It's like rain on your wedding day; It's a free ride when you've already paid; It's the good advice that you just didn't take; Who would've thought... it figures “ (Alanis Morissette)..*

À minha amiga Pâm por todos esses anos de amizade, pela companhia, pelos conselhos, conversas, risadas, lágrimas..obrigada por ter vivenciado tudo isso comigo.

Aos amigos funcionários Max e Rosemira, que sempre estiveram dispostos a ajudar. Agradeço pelos conselhos e histórias que me fizeram dar muitas risadas.

Muito obrigada por tudo, guardarei-os sempre em meu coração.

Aos meus amigos da Comunidade Ami, por rezarem sempre por mim, e me apoiarem nos momentos difíceis com palavras amigas de incentivo. Muito obrigada!

Às minhas amigas do hospital, Fernanda, Natália, Helôisa e Soninha, por terem acreditado em mim, me apoiando sempre em tudo, sei que sem a compreensão e ajuda de vocês teria sido ainda mais difícil. Muito obrigada, adoro vocês!

Aos colegas Marília, Rodrigo, Mariana, Carol, Karina, pela ajuda na execução deste trabalho, disponibilidade e amizade.

À todos os professores da minha graduação e pós- graduação pelas contribuições à minha formação e pelo incentivo à carreira acadêmica. Em especial à Prof.^a Dr.^a

Cleni M. M. Machado e à Prof.^a Dr.^a Miriane da Costa Gileno, que me despertaram o amor pela Hematologia com um jeito especial e apaixonado de lecionar, que subjetivamente me incentivaram a seguir carreira acadêmica.

Agradeço muito à Miriane pela enorme ajuda, apoio e amizade. Muito obrigada!

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca pela orientação, e por me transmitir parte de seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Valdecir pela sua incomensurável ajuda na execução deste trabalho, por toda sua disponibilidade, apoio, atenção, solicitude e pelas valiosas explicações, que fizeram que esta pesquisa acontecesse. Muito obrigada!

Aos membros da banca de qualificação, Prof.^a Dr.^a Eliana Aparecida Varanda e Prof.^a Dr.^a Maria Stella G. Raddi que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Passeto Falcão e à Biomédica Aglair Garcia, do laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, pela utilização do citômetro de fluxo.

À Cláudia, Laura e Sônia da Seção de Pós- Graduação pela paciência, ajuda e solicitude com que sempre me atenderam.

À todos aquele que, contribuíram para a realização deste trabalho,
seja com uma palavra de incentivo, um sorriso ou pelo simples fato de
acreditarem que eu seria capaz. Muito obrigada!

O que fica em repouso, é mais fácil de manusear.

O que ainda não está desenvolvido, é mais fácil de gerenciar.

O que é fraco, é mais de controlar.

O que ainda é pequeno, é mais fácil de dirigir.

Resolva as pequenas preocupações antes que elas cresçam.

Controle os pequenos problemas antes que eles escapem das suas mãos.

Porque a maior árvore foi apenas um broto, a torre mais alta começou com o primeiro tijolo e a mais longa jornada começou com o primeiro passo.

Lao Tsu

RESUMO

A terapia pró-droga/enzima direcionada por anticorpo (ADEPT) consiste em uma primeira etapa, no direcionamento de uma enzima veiculada por anticorpo à uma célula tumoral. Numa segunda etapa uma pró-droga inócua é administrada, e, na presença da enzima, produz compostos citotóxicos restritos à localização do tumor. O par enzima/pró-droga *horseradish peroxidase* (HRP)/ ácido 3- indol acético (IAA) tem sido aplicada nas estratégias ADEPT. Nesta combinação, o hormônio de planta não tóxico IAA é ativado para espécies citotóxicas pela ação catalítica da HRP. A elucidação das etapas e produtos da reação IAA/HRP levou uma série de moléculas produto a serem apontadas como responsáveis pelos efeitos citotóxicos sem que, até o presente momento, o mecanismo de citotoxicidade tenha sido elucidado. Nesse trabalho, utilizando-se células McCoy como alvo, foi constatado um efeito citotóxico dose dependente do sistema IAA/HRP, por necrose. Esse efeito é quase completamente abolido com a utilização de substâncias antioxidantes ou em anaerobiose. Também foi estudado o uso de um Ester derivado do IAA, o Etil Ester do IAA, como uma nova combinação citotóxica pró-droga/ enzima. Foi constatado que a HRP isolada não consegue catalizar a oxidação do Etil Ester do IAA na ausência de uma enzima adicional (esterase). Dessa forma, pode-se controlar a citotoxicidade do IAA pelo uso de duas enzimas, HRP e esterase. Finalmente, foram apresentadas evidências da aplicação potencial da tríade: Etil Ester IAA/ esterase/ HRP como uma estratégia potencial para a metodologia ADEPT e correlata.

Palavras- chave: ADEPT; IAA (ácido 3-indol acético); Etil Ester do ácido 3-indol acético; HRP (horseradish peroxidase); esterase ; células McCoy.

ABSTRACT

The antibody-directed enzyme pro-drug therapy (ADEPT) in a first stage, it's directed to an enzyme carried to an antibody to a tumor cell. In a second stage a pro-drug harmless is administered, and in the presence of the enzyme, produces cytotoxic compounds restricted the location of the tumor. The pair enzyme / pro-drug horseradish peroxidase (HRP)/ 3 - indole acetic acid (IAA) has been applied in ADEPT strategies. In this combination, the nontoxic plant hormone nontoxic IAA is activated for cytotoxic species by the action of catalytic HRP. The elucidation of the steps and products of the reaction IAA/ HRP led to a series of product molecules identified as being responsible for cytotoxic effects, without, so far, the mechanism of cytotoxicity has been elucidated. In this work, using cells McCoy as a target, we have seen a cytotoxic effect dose-dependent system IAA/ HRP, for necrosis. This effect is almost completely abolished with the use of antioxidant substances or oxygen depletion. We also studied the use of an Ester derived from the IAA, the Ethyl Ester of the IAA, as a new combination cytotoxic pro-drug/ enzyme. We have seen that the HRP alone can not catalyze the oxidation of Ethyl Ester of the IAA in the absence of an additional enzyme (esterase). Thus, we can control the cytotoxicity of the IAA for the use of two enzymes, HRP and esterase. Finally, we showed evidence of the potential application of the triad: Ethyl Ester IAA/esterase/ HRP as a potential strategy for the methodology ADEPT and correlates.

Keywords: ADEPT / IAA (3-indole acetic acid); Ethyl Ester of 3-indole acetic acid; HRP (horseradish peroxidase); esterase; McCoy cells.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xix
1. Introdução.....	22
1.1. O modelo de tratamento do câncer baseado no binômio enzima/ pró-droga.....	23
1.2. O mecanismo da citotoxicidade do IAA associado a peroxidases.....	24
1.3. Melatonina (antioxidante endógeno).....	29
1.4. Ácido ascórbico (antioxidante exógeno).....	31
1.5. <i>Horseradish peroxidase</i> (HRP) e sua ação no IAA.....	32
2. Objetivos	35
2.1. Objetivos gerais.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. Materiais e métodos.....	38
3.1. Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	39
3.1.1. Substâncias químicas e células.....	39
3.1.2. Meio de cultivo e soluções.....	39
3.1.3. Experimentos.....	41
3.1.3.1. Teste de citotoxicidade pelo método do Vermelho Neutro.....	41
3.1.3.2. Teste de citotoxicidade pelo método de exclusão do Azul de Trypan.....	42
3.1.3.3. Teste do efeito da Melatonina.....	43
3.1.3.4. Teste do efeito do Ácido Ascórbico.....	43
3.1.3.5. Teste do efeito do borbulhamento de Nitrogênio e Oxigênio no meio.....	44
3.1.3.6. Avaliação da apoptose e necrose por citometria de fluxo.....	44

3.1.3.7.	Estudo do consumo de Oxigênio.....	46
3.1.3.8.	Estudo cromatográfico líquido de alta performance (HPLC).....	46
4.	Resultados.....	47
4.1.	Avaliação da citotoxicidade para as células McCoy do sistema IAA/HRP pelo teste do Vermelho Neutro.....	48
4.2.	Avaliação da citotoxicidade para as células McCoy do sistema IAA/HRP pelo método de exclusão do Azul de Trypan.....	51
4.3.	Análise estatística dos dados obtidos por citometria de fluxo.....	58
4.4.	Utilização da tríade Ester IAA/ esterase/HRP como um modelo alternativo ao sistema IAA/HRP.....	63
5.	Discussão.....	69
6.	Conclusões.....	79
7.	Referências Bibliográficas.....	81
8.	Anexos.....	92
8.1.	Avaliação da citotoxicidade para as células McCoy do sistema IAA/HRP por citometria de fluxo.....	93
8.1.1.	Análise da citotoxicidade realizada por citometria de fluxo. Células McCoy ($4,5 \times 10^4$ /mL) IAA (1mM e 2mM) e HRP (1 μ M final) em meio PBS com incubação de 1 hora.....	93
8.1.2.	Análise da citotoxicidade realizada por citometria de fluxo. Células McCoy ($4,5 \times 10^4$ /mL) IAA (1mM e 2mM) e HRP (1 μ M final) em meio PBS com incubação de 5 horas.....	94
8.1.3.	Análise da citotoxicidade realizada por citometria de fluxo. Células McCoy ($4,5 \times 10^4$ /mL) IAA (1mM e 2mM) e HRP (1 μ M final) em meio Eagle com incubação de 1 hora.....	95

8.1.4. Análise da citotoxicidade realizada por citometria de fluxo. Células McCoy ($4,5 \times 10^4$ /mL) IAA (1mM e 2mM) e HRP (1 μ M final) em meio Eagle com incubação de 5 horas.....	96
8.2. Trabalho submetido à revista Biological Chemistry (Biomed)	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação dos principais alvos estratégicos de potencial valor na terapia do câncer pelo sistema IAA/HRP. ADEPT; PDEPT e GDEPT.....	28
Figura 2	Principais vias de reação envolvidas na ativação do IAA pela HRP.....	33
Figura 3	Efeito de indução de citotoxicidade pela associação IAA/HRP (1 μ M final) em células McCoy (6 x 10 ⁴ /mL), pelo método de Vermelho Neutro.....	49
Figura 4	Avaliação dos efeitos protetores do ácido ascórbico (10mM) e catalase (100 μ L) no sistema IAA/HRP (1 μ M final) em células McCoy (6x 10 ⁴ /mL), pelo método do Vermelho Neutro.....	50
Figura 5	Porcentagem de morte celular após 15, 30, 45 e 60 minutos de incubação em banho-maria (37°C). Células McCoy 1x 10 ⁶ /mL em um volume final de 500 μ L em PBS.....	52
Figura 6	Citotoxicidade do par IAA/HRP nas células McCoy avaliadas no ensaio de exclusão do Azul de Trypan. Células McCoy (1x 10 ⁶ /mL), 1 μ M. HRP. Os resultados foram obtidos da média e desvio padrão das triplicatas. (Inserção). Controles com 2mM IAA ou 1 μ M HRP contra sistema completo.....	53
Figura 7	Estudo da concentração da melatonina como agente protetor da citotoxicidade das células McCoy (1x 10 ⁶ /mL) com IAA (2mM) + HRP (1 μ M), pelo método de Azul de Trypan. Incubação a 37°C por 1 hora.....	54

- Figura 8 Efeito da anaerobiose na percentagem de morte de células McCoy ($1 \times 10^6/\text{mL}$) com IAA (2mM) + HRP ($1\mu\text{M}$), pelo método de Azul de Trypan. Incubação a 37°C por 1 hora..... 55
- Figura 9 Aumento da citotoxicidade do sistema HRP ($1\mu\text{M}$) + IAA (0,5; 1,0 e 1,5mM), pelo borbulhamento de O_2 no meio, pelo método de Azul de Trypan. Incubação a 37°C por 1 hora..... 56
- Figura 10 Efeito protetor de substâncias antioxidantes na indução de citotoxicidade pela associação IAA (2mM final) + HRP ($1\mu\text{M}$ final) em células McCoy ($1 \times 10^6/\text{mL}$). Volume final da reação = $500\mu\text{L}$, pelo método de Azul de Trypan. Incubação a 37°C por 1 hora..... 57
- Figura 11 Citometria de fluxo: Necrose observada após 1 hora de incubação, em meio PBS: **N** = % células mortas por necrose; **A** = % células mortas por apoptose; CT= controle. Análise estatística: *test t Student* (teste vs controle) n.s = não significativo..... 60
- Figura 12 Citometria de fluxo: Necrose observada após 5 horas de incubação, em meio PBS: **N** = % células mortas por necrose; **A** = % células mortas por apoptose; CT= controle. Análise estatística: *test t Student* (teste vs controle)..... 61
- Figura 13 Citometria de fluxo: Necrose observada após 5 horas de incubação, em meio Eagle: **N** = % células mortas por necrose; **A** = % células mortas por apoptose; CT= controle. Análise estatística: *test t Student* (teste vs controle)..... 62

Figura 14a	Consumo de oxigênio provocado pela oxidação do IAA ou Etil ester IAA catalizado por HRP. Quando continha 1 mM IAA, ou 1mM Etil ester IAA; 0,5 μ M HRP e várias concentrações de esterase em 0,05 M de tampão fosfato em pH 5,5 à 37°C.....	63
Figura 14b	Consumo de oxigênio provocada pela oxidação do IAA ou Etil ester IAA catalizada por HRP.	64
Figura 15	Perfil Cromatográfico de IAA e Etil Ester IAA. 1mM IAA ou 1mM Etil ester IAA, 0,5 μ M HRP; 3,0 U/mL esterase em 0,05 M tampão fosfato pH 5.5 à 37°C.....	66
Figura 16	Avaliação do potencial do Etil éster do IAA na concentração 3,125mM + esterase (10 μ L)+ HRP (1 μ M) como um sistema alternativo ao modelo IAA/HRP, pelo método de Vermelho Neutro.....	67
Figura 17	Citotoxicidade da tríade Etil Ester IAA /esterase / HRP nas células McCoy avaliadas pelo ensaio do Azul de Trypan. Células McCoy (1x10 ⁶ cels/mL), 2 mM Etil ester IAA, 1 μ M HRP, 5 U/mL esterase. Os resultados foram obtidos da média e desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.....	68
Figura18	Proposta para o uso do ester derivado do IAA como uma pró- droga dependente de duas enzimas para estratégia de ADEPT.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C:	graus Celsius
µg:	micrograma
µL:	microlitro
µM:	micromolar
µs:	microssegundos
A:	apoptose
AA:	ácido ascórbico
Ac:	anticorpo
ADEPT:	terapia pró-droga/enzima direcionada por anticorpo
AU:	unidades de absorvância
BXPC- 3:	células humanas de câncer de pâncreas
CaCl ₂ :	cloreto de cálcio
CO ₂ :	dióxido de carbono
CAT:	catalase
DHAA:	ácido desidroascórbico
DO:	densidade óptica
e ⁻ :	elétron
EROs:	espécies reativas de oxigênio
FaDu:	carcinoma de nasofaringe
g:	grama

G361:	células humanas de melanoma
GDEPT:	terapia pró- droga enzima direcionada por gene
h:	hora
H ⁺ :	íon hidrogênio
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrogênio
HRP:	<i>horseradish peroxidase</i>
HT29:	carcinoma de cólon
IAA:	ácido 3- indol- acético
IV:	intra- venoso
kDa:	Kilodalton
KH ₂ PO ₄ :	hidrogenofosfato de potássio
M:	molar
MCF-7:	adenocarcinoma de mama
mel:	melatonina
mg:	miligrama
min:	minutos
mL:	mililitro
mM:	milimolar
MO:	Missouri
MOI:	3-metileno-2- oxindol
N ₂ :	gás nitrogênio
NaCl:	cloreto de sódio

N:	necrose
nm:	nanômetro
NaOH:	hidróxido de sódio
$^1\text{O}_2$:	oxigênio singlete
p53:	gene supressor tumoral
PBS:	tampão fosfato- salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDEPT:	terapia pró-droga/enzima direcionada por polímero
pKa:	constante de dissociação ácida
PI:	iodeto de propídeo
PM:	peso molecular
rpm:	rotações por minuto
T24:	carcinoma de bexiga
U:	unidade
UV:	ultra- violeta
vs:	<i>versus</i>

1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1. O modelo de tratamento do câncer baseado no binômio enzima/ pró-droga

O tratamento do câncer é um dos maiores desafios médicos da atualidade e vem sofrendo avanços nas últimas décadas. Apesar de todo arsenal terapêutico disponível, a possibilidade de cura ainda atinge níveis insatisfatórios e a toxicidade relacionada ao tratamento ainda é elevada. Modalidades terapêuticas que direcionam o agente tóxico seletivamente à célula tumoral, poupando tecidos normais de danos, estão sendo extensivamente estudadas como principal meta para o combate desta doença. Até o momento, mais de 400 estudos clínicos relacionados à terapia direcionada estão em andamento no mundo, sendo mais da metade desses relacionados a tratamentos antitumorais (HERMMINKI; ALVAREZ., 2000).

Uma abordagem promissora que vem sendo cada vez mais estudada baseia-se em uma estratégia de duas etapas: inicialmente uma enzima não-tóxica é anexada à célula tumoral, a qual, em um segundo momento, é exposta a uma pró-droga que, na presença da enzima, converte-se em uma citotoxina (GRECO, DACHS., 1994; BAGSHAWE et al., 2001). Para que tal efeito possa ter aplicabilidade, algumas condições devem ser preenchidas: a enzima deve possuir alta atividade catalítica em condições fisiológicas e, capacidade de ativação

rápida e eficiente da pró-droga, até mesmo em baixas concentrações do substrato e independentemente da ativação de outros mecanismos enzimáticos celulares. A citotoxicidade induzida pelo complexo enzima/pró-droga deve idealmente não depender da fase do ciclo celular ou ciclo proliferativo para agir em um maior número de células tumorais possíveis (GRECO., 2001).

Pesquisas mostraram que o IAA, do inglês *índole-3-acetic acid*, um hormônio de crescimento encontrado em plantas, quando oxidado por peroxidase produz moléculas citotóxicas que, por sua vez, podem ser usadas para o tratamento do câncer (FOLKES et al., 1999; FOLKES; WARDMAN., 2001).

1.2. O mecanismo da citotoxicidade do IAA associado a peroxidases

O IAA é um hormônio de crescimento encontrado em plantas, afetando sua diferenciação, divisão e expansão (ENGVILD., 1989; BANDURSKI et al., 1995). A atividade do hormônio é regulada através de duas vias de metabolização irreversíveis: oxidação por peroxidases levando à decarboxilação da molécula e reação de não-decarboxilação formando conjugados não reativos. A primeira delas, catalisada por enzimas peroxidases, tem sido extensivamente estudada e envolve vias complexas, culminando com a formação de radicais livres.

A peroxidase encontrada na planta *Aromacia rusticana* (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*) é uma enzima que contém uma molécula de heme, sendo encontrada naturalmente na forma férrica (VEITCH., 2004). A HRP pode oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos e não-orgânicos utilizando

peróxido de hidrogênio e é intensamente explorada comercialmente, por exemplo, para uso em kits diagnósticos e ensaios imunológicos. Interesse especial sobre a enzima surgiu após demonstração de que é capaz de oxidar o IAA, formando compostos com capacidade citotóxica para células de mamíferos (incluindo células tumorais), mesmo **sem a presença de peróxido de hidrogênio**.

O mecanismo exato de toxicidade da associação IAA/HRP não é conhecido, porém, vários estudos sugerem a formação de radicais livres e também de uma citotoxina estável ainda não identificada (capaz de causar danos celulares mesmo após separação da enzima através de filtros que retém moléculas de alto peso molecular e também capaz de atravessar a membrana celular e levar a lesões em componentes nucleares) (FOLKES et al., 1996; FOLKES et al., 1999; FOLKES, WARDMAN., 2001). A adição de substâncias antioxidantes (como ácido ascórbico, glutathione, α -tocoferol, β -caroteno e trolox, uma forma hidrossolúvel de vitamina E) ou antagonistas do IAA (triptofano) mostrou ser capaz de reduzir os danos celulares causados pela reação de oxidação em questão (CANDEIAS et al., 1996; KAWANO et al., 2001; KAWANO., 2003).

A morte celular induzida por IAA/HRP ocorre tanto em condições de normóxia ou hipóxia (esta última geralmente encontrada no microambiente tumoral) (GRECO et al., 2001), e pode ser observada de diversas formas, principalmente através de danos na membrana celular e no DNA (FOLKES et al., 1999; GRECO et al., 2002). A lesão na membrana celular acontece por peroxidação lipídica, embora alguns estudos recentes contestem essa possibilidade (KIM et al., 2006). As lesões no DNA são demonstradas pelo

aumento na quantidade de DNA circular e linear, assim como por aumento no peso molecular da molécula, que pode ser observado através de análise por eletroforese em gel (FOLKES et al., 1999).

A ação do IAA/HRP nas células de mamíferos leva a condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos, fragmentação do DNA e ligação a anexina V (GRECO., 2002), eventos similares aos observados quando as células são incubadas com cisplatina, um agente indutor de apoptose. A via das caspases (IGNEY; KRAMMER., 2002; SCHIMITT., 2003), parece ser uma das responsáveis no processo apoptótico induzido por IAA/HRP, uma vez que o tratamento com inibidor de caspase reduz em 30% a quantidade de micronúcleos, em 50% a de DNA fragmentado e em 60% a de cromatina condensada (GRECO et al., 2002). Porém, o processo de apoptose não pode ser considerado único responsável pela morte celular, uma vez que a perda da integridade da membrana (característico de um processo de necrose) também é observado nas células tratadas (MELO et al., 2004). O mecanismo da citotoxicidade causada por esse tratamento é complexo com variações em diferentes células tumorais estudadas e parece envolver várias vias de lesão celular e ainda tem que ser estudado mais detalhadamente.

O direcionamento da enzima HRP às células tumorais já foi realizado de diversas maneiras *in vitro* (procedimentos: ADEPT, PDEPT, GDEPT) (fig. 1). ADEPT: terapia pró-droga/enzima direcionada por anticorpo, onde um anticorpo contendo a HRP é criado e exposto à células tumoral, o qual vai se aderir à um epítipo da célula, é adicionado IAA ao meio que, ao entrar em contato com a

célula tumoral contendo um anticorpo aderido à sua membrana contendo HRP, produzirá uma toxina levando a célula à morte .

PDEPT: terapia pró-droga/enzima direcionada por polímero, é criada uma macromolécula, polímero, que contenha a HRP, por ser uma molécula grande só passará nos vasos que irrigam o tumor por serem mais permeáveis à macromoléculas, sendo assim o polímero passa e fica no local do tumor, em um segundo momento eu adiciono IAA ao sistema, que quando passar pelo local do tumor que contém polímeros com HRP produzirá toxina levando as células tumorais à morte.

GDEPT: terapia pró- droga enzima direcionada por gene, onde é criado um vírus ou um plasmídeo que veicule a HRP para o gene da célula tumoral, a célula tumoral “infectada” pelo vírus contendo o HRP vai transcrever e reproduzir mais células contendo em seu gene a HRP, ao adicionar IAA ao meio, ao entrar em contato com essas células contendo em seu gene HRP transcrita haverá a produção de toxina que levará as células tumorais à morte.

A observação de que o IAA é uma substância muito bem tolerada em humanos (MIRSKI; DIENGOTT., 2004), fortalece a idéia de que esse binômio enzima/ pró-droga poderá ter aplicabilidade *in vivo*.

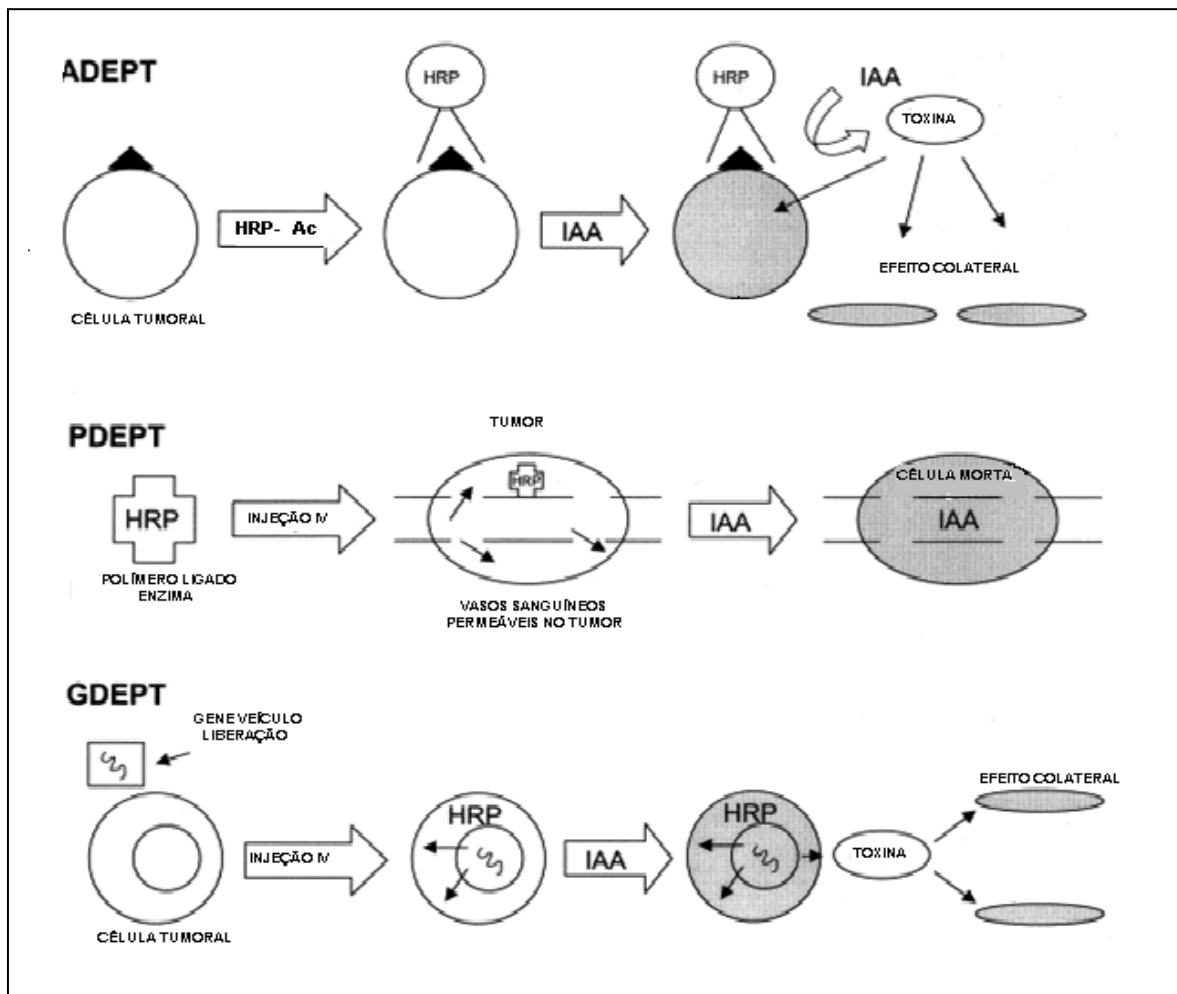


Figura 1: Representação dos principais alvos estratégicos de potencial valor na terapia do câncer pelo sistema IAA/HRP. (FOLKES; WARDMAN., 2001). ADEPT: terapia pró-droga/enzima direcionada por anticorpo; PDEPT: terapia pró-droga/enzima direcionada por polímero e GDEPT: terapia pró-droga enzima direcionada por gene.

Em um estudo utilizando o direcionamento da peroxidase via terapia gênica em células de adenocarcinoma de mama MCF-7, carcinoma de bexiga T24 e carcinoma de nasofaringe FaDu, foi observado cerca de 70-90% de morte celular (GRECO et al., 2001). Ainda, pode-se inferir que o status do gene p53 das células parece não interferir na citotoxicidade mediada por IAA/HRP, uma vez que a linhagem FaDu, possui mutações nesse gene, sendo que o efeito observado na

morte celular dessas células foi o mesmo daquele encontrado naquelas células que possuem o tipo selvagem do p53.

Alguns estudos mostraram inibição de crescimento e indução de apoptose em outras linhagens celulares de tumores humanos: linhagem G361 de células humanas de melanoma, (KIM., 2004), linhagem BXPC-3 de células humanas de câncer de pâncreas, (HUANG., 2005), linhagens de tumores de cabeça e pescoço (TUPPER., 2004).

Esses estudos confirmam a atividade citotóxica da associação IAA/HRP em linhagens de células tumorais humanas.

1.3. Melatonina (antioxidante endógeno)

A melatonina é um neuro- hormônio produzido pela glândula pineal e, apresenta como principal função regular o sono. Esse hormônio é produzido a partir do momento em que fechamos os olhos. Na presença de luz, entretanto, é enviada uma mensagem neuro- endócrina bloqueando a sua formação, portanto, a secreção dessa substância é quase exclusivamente determinada por estruturas fotossensíveis, principalmente à noite. A melatonina também é produzida a partir de um aminoácido chamado triptofano, normalmente ingerido numa alimentação equilibrada. Dessa forma, a seqüência seria o triptofano se transformar em serotonina, e esta em melatonina. É por isso que a concentração de serotonina fica aumentada na glândula pineal durante o dia, enquanto há luz, inversamente ao que ocorre com a melatonina. Quando a luz incide na retina, o nervo óptico e

as demais conexões neuronais levam à glândula pineal essas informações inibindo a produção da melatonina. A maior produção da melatonina ocorre à noite, entre 2:00 e 3:00 horas da manhã, num ritmo de vida normal, e esta produção aumentada produz sono (BALLONE., 2002).

Além de induzir o sono, a melatonina é um **poderoso agente antioxidante** endógeno que, como outros antioxidantes, pode retardar o processo de envelhecimento. Como antioxidante a melatonina possivelmente reduz o nível do hormônio catabólico cortisol. Existem também evidências de que a melatonina estimula a produção de hormônio do crescimento. A adrenalina e o cortisol induzem a formação de uma enzima, a triptofano pirolase, capaz de destruir o triptofano antes que este atinja a glândula pineal. Com isto, nem a melatonina é fabricada e nem a serotonina (o que pode gerar compulsão de ingestão de hidrato de carbono, com tendência a aumento de peso e depressão). A melatonina é uma substância anti-radical livre, portanto, antioxidante. Esta é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (membrana que protege o cérebro), portanto, capaz de desempenhar funções em nível neuronal. Essa ação é de fundamental importância na proteção dos neurônios contra as lesões dos radicais livres. Nosso tecido cerebral é muito mais suscetível à ação dos radicais livres que qualquer outra parte do nosso organismo e na medida em que os níveis de melatonina vão caindo pode haver um concomitante declínio na função cerebral (BALLONE., 2002).

1.4. Ácido Ascórbico (antioxidante exógeno)

O AA é um composto solúvel em água e um dos principais antioxidantes do organismo. Além do AA outra forma biologicamente ativa da vitamina C é o DHAA. A vitamina C é um nutriente essencial presente principalmente em frutas cítricas, folhas verdes e tomate (IMEN., 2006).

A vitamina C participa como co-fator de uma grande variedade de reações químicas fundamentais para a manutenção da saúde. Além de fazer parte da síntese e do metabolismo de neurotransmissores, a vitamina C está envolvida na produção de corticosteróides e aldosterona, absorção e utilização do ferro e biossíntese de carnitina. A carência dietética de vitamina C acarreta no desenvolvimento do escorbuto - doença caracterizada inicialmente por defeitos na formação de tecido conjuntivo, seguido de manifestações hemorrágicas, incluindo sangramento no interior das articulações e cavidade peritoneal. A incapacidade da gengiva resistir à inflamação e sangramentos parece representar um sinal precoce da deficiência desta vitamina (IMEN., 2006)

O AA é considerado o **mais importante e potente antioxidante nutricional hidrossolúvel**. No plasma, a vitamina C pode doar prontamente elétrons para várias espécies reativas, retornando facilmente a seu estado reduzido, eliminando-as antes que reajam com as membranas e lipoproteínas biológicas. De fato, estudos em animais e em humanos demonstram que a deficiência de AA induzida pela dieta levou à lesão miocárdica por peroxidação lipídica, sendo esse dano prevenido pela administração de suplementos de AA. A

vitamina C também possui habilidade em restabelecer a atividade antioxidante do Beta-caroteno e do Alfa-tocoferol. O AA pode reagir com o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila, radical peroxil e radical superóxido neutralizando sua reatividade (IMEN., 2006).

1.5. *Horseradish peroxidase* (HRP) e sua ação no IAA

A peroxidase de raiz forte (HRP) é, provavelmente, a peroxidase mais estudada e pode ser facilmente extraída da planta “rábano silvestre - raiz forte”, da qual provém seu nome.

Essa enzima tem uma massa molecular de 42,1 KDa, é uma heme proteína cujo grupo prostético, a protoporfirina IX, está ligada não covalentemente à parte protéica da molécula (O'BRIEN., 2000).

A HRP é uma peroxidase que pode oxidar uma grande variedade de substratos na presença de peróxido de hidrogênio, catalisando a oxidação de um elétron por meios das suas isoformas HRP I e HRP II (esquema inserido na figura 2). A reação entre IAA e HRP foi estudada inicialmente pela importância na bioquímica das plantas, porém, o mecanismo é extremamente complexo e ainda não totalmente elucidado.

Um fator crucial na reação do IAA e HRP é que o peróxido de hidrogênio não é requerido para oxidar a HRP nativa para composto I, ao contrário de outras reações com muitos outros substratos da enzima (como por exemplos fenóis).

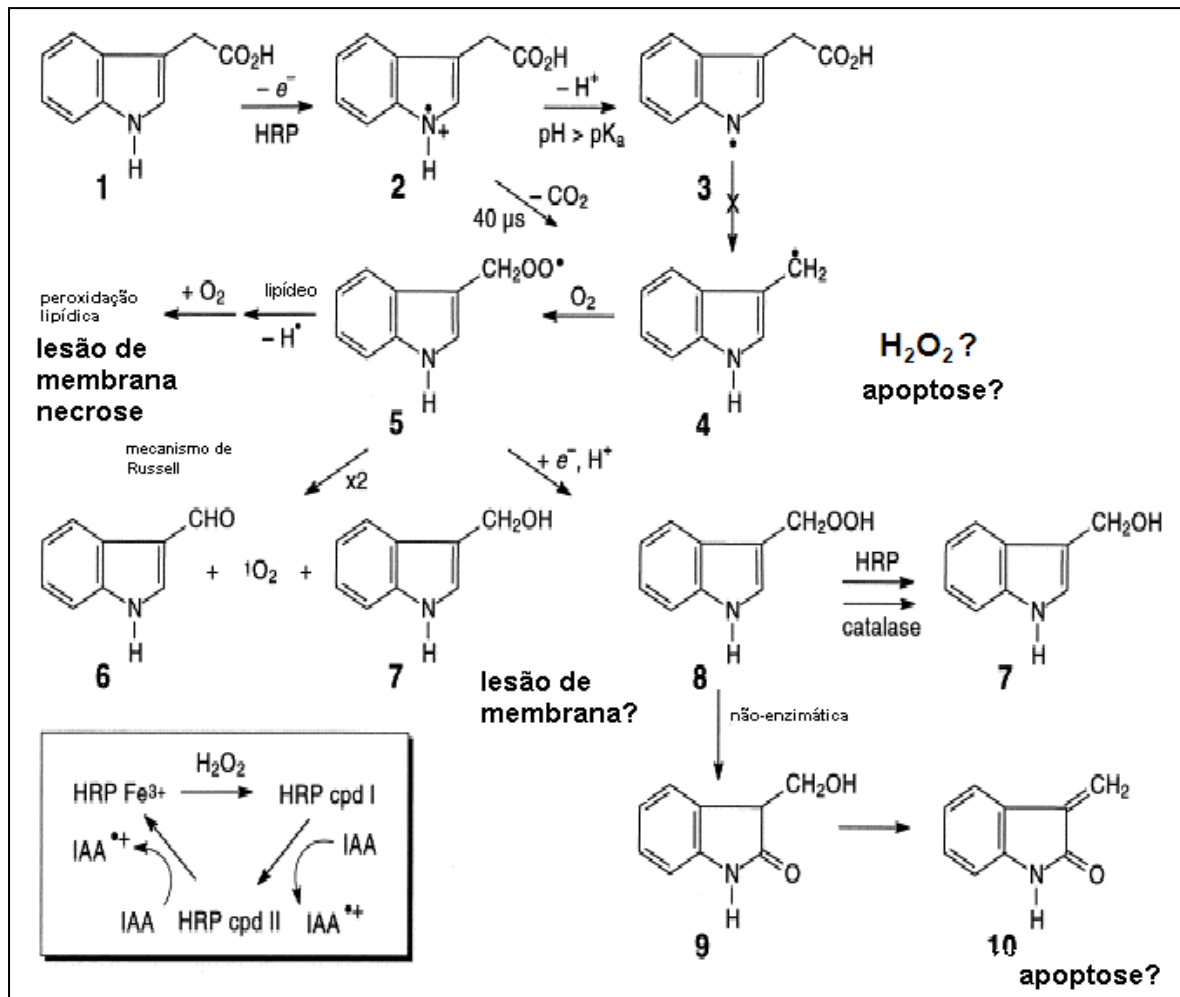


Figura 2: Principais vias de reação envolvidas na ativação do IAA pela HRP. Modificado de: FOLKES; WARDMAN., 2001.

A HRP composto I e II oxidam o IAA (**1**) em pH neutro, para a formação de um cátion radical INDOLIL (**2**). Esse cátion se dissocia para formar outro radical INDOLIL (**3**) desprotonado. Apenas o primeiro radical INDOLIL cátion (**2**) sofre descarboxilação em aproximadamente 40 microssegundos para formar o radical ESCATOIL (**4**). Esse radical centrado em carbono é muito reativo com o oxigênio, formando rapidamente um PEROXIL (**5**). O radical PEROXIL sofre um decaimento por dois processos: a) redução e protonação formando o HIDROPERÓXIDO ESCATOL (**8**), o qual reage novamente com o HRP-I para formar o INDOL-3-CARBINOL (**7**) e também o HIDROPERÓXIDO ESCATOL

pode se decompôr por um processo não enzimático para OXINDOL-3-CARBINOL **(9)** e MOI (3-metileno-2-oxindol), **(10)***. E b) O radical PEROXIL **(5)** pode sofrer combinação e eliminação pelo mecanismo de RUSSEL, no qual dois radicais peroxil se combinam formando o INDOL-3-ALDEÍDO **(6)**, INDOL-3-CARBINOL **(7)** e OXIGÊNIO SINGLETE, embora essa via possa não ocorrer em pH fisiológico (FOLKES; WARDMAN., 2001).

Considerando a alta especificidade que a HRP tem sobre o IAA, nós hipotetizamos que seu Etil Ester IAA poderia não ser reconhecido pela enzima, conseqüentemente, poderíamos ligar a geração de espécies citotóxicas à ação de duas enzimas: Etil Ester do IAA/esterase gerando IAA e finalmente IAA/HRP gerando compostos citotóxicos.

*Segundo (FOLKES; WARDMAN., 2001), essa seria na realidade a molécula candidata mais provável como responsável pelo efeito citotóxico do sistema IAA/HRP.

2.OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

A associação de IAA/HRP, já provou causar danos a diversas linhagens celulares de tumores humanos e vem sendo estudada como forma promissora de terapia direcionada ao câncer. Na literatura, diferentes mecanismos de morte celular têm sido observados para diferentes células tumorais sem a descrição de um claro mecanismo consensual. Esse modelo de dano celular (IAA/HRP) não foi ainda testado para células tumorais do tipo McCoy, o que nos levou a estudar a morte dessas células nesse contexto, tentando-se elucidar o(s) mecanismo(s) pelo qual ela ocorre.

Serão avaliados os efeitos de um antioxidante endógeno como a melatonina, e um exógeno como o AA, observando-se seus possíveis efeitos protetores, uma vez que alguns dos principais produtos da interação IAA/HRP são radicais livres entre os quais radicais livres de oxigênio (figura 1). A possibilidade da formação nessa reação de H_2O_2 foi recentemente aventada como o elemento chave na citotoxicidade do sistema (KIM et al.,2006). Dessa forma também avaliaremos o efeito da catalase nos nossos experimentos de citotoxicidade.

Uma outra interessante possibilidade que será avaliada é a utilização do Etil éster do IAA como a pró- droga, no lugar do IAA. Dessa forma, com a adição ao sistema de mais uma enzima, a esterase, o IAA seria reconstituído e na

seqüência utilizado como substrato pela HRP desencadeando o processo citotóxico.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Estudar os efeitos da associação IAA/HRP, na viabilidade de células McCoy usando o método de coloração com Vermelho Neutro, coloração com Azul de Trypan e por Citometria de Fluxo (anexina/iodeto de propídeo).

2.2.2. Estudar o efeito do ácido ascórbico, melatonina e catalase como possíveis agentes protetores da associação descrita no item 2.2.1 no que se refere à indução de citotoxicidade.

2.2.3. Estudar o efeito da ação de aeração (O_2) e anóxia (N_2) na reação IAA/HRP, na produção de efeitos citotóxicos.

2.2.4. Estudar o potencial do sistema Etil Éster do IAA + esterase + HRP como um processo alternativo e mais seletivo para geração de espécies citotóxicas, ao modelo IAA/HRP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Determinação da citotoxicidade *in vitro*

3.1.1. Substâncias químicas e células

- O IAA, ácido etil ester 3-indol-acético, melatonina, ácido ascórbico, Vermelho Neutro, esterase de fígado suíno (suspensão sulfato amônio, 160 unidades/mL) e HRP tipo VI, foram adquiridos da Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- Azul de Trypan foi obtido da Vetec (RJ, Brasil).
- Células McCoy de fibroblasto de rato (ATCC CRL 1696) foram obtidas da Seção de Cultura Celular do Instituto Adolfo Lutz (SP, Brasil), transformadas continuamente dentro de uma linhagem celular e, freqüentemente, empregadas para avaliar toxicidade basal *in vitro*.

3.1.2. Meio de cultivo e soluções

- Meio de cultivo para células McCoy: constituído por meio Eagle (Instituto Adolfo Lutz) adicionado de 7,5% de soro fetal bovino (Cultilab).

- Tampão PBS: solução A: 0,908 g de KH_2PO_4 /100 mL; solução B: 0,9475 g de KH_2PO_4 /100 mL. Misturar 28,5 mL de solução A para 71,5 mL de solução B. Acrescentar 0,85 g de NaCl. Ajustar pH = 7,2- 7,4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Substâncias testes: as soluções dos indóis foram utilizadas nas concentrações finais de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,15 e 6,25 mM. A HRP será utilizada na concentração 1 μM final. Esterase 0,5; 1,5; 3,0 e 5,0 U/mL.
- Solução de Vermelho Neutro: solução estoque do corante vermelho neutro (0,4% em tampão PBS) (Neutralrot Redox-Indikator – Riedel-de-Haën AG Seelze-Hannover – cod. 326.60) foi diluída a 50 $\mu\text{g/mL}$ em meio Eagle sem soro. Após 24 horas de incubação, a 37°C, a solução foi submetida à centrifugação (1500 rpm – 10 minutos), para remoção dos cristais remanescentes.
- Solução de Ácido Ascórbico: (PM: 176,13), foi preparada a uma concentração de 100mM (estoque) (0,0175g de ácido ascórbico em 1mL de água deionizada).
- Solução de Melatonina: solução de melatonina foi preparada em uma concentração de 120mM (estoque) em PBS.

- Azul de Trypan: solução de Azul de Trypan foi preparada com 0,2g de azul de Trypan em 100mL de solução salina fisiológica.
- Anexina: *Annexin V-FITC* (BD Biosciences - Cat. No.51-65874X). Foram utilizados 3 μ L por teste. Estocado a 4°C.
- Iodeto de Propídio: *Propidium Iodide* (BD Biosciences - Cat. No.51-66211E). Foram utilizados 6 μ L por teste. Estocado a 4°C.
- Tampão : 10X *Annexin V Binding Buffer* (BD Biosciences - Cat.No.51-66121E) 0,1 M NaOH (pH 7,4) 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂. A solução foi esterilizada e filtrada. Para obtenção da solução de trabalho, foi diluída uma parte do tampão para nove partes de água destilada.

3.1.3. Experimentos

3.1.3.1. Teste de Citotoxicidade pelo método do Vermelho Neutro

Células McCoy B (ATCC 1696) foram mantidas em meio Eagle. Após tripsinização (2 mL de solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz), as células foram contadas em câmara de Neubauer e 200 μ L do meio contendo aproximadamente 1×10^5 células/mL foram inoculados em microplacas

(96 orifícios) para cultura de tecido (Corning, cód. 25860) as quais foram incubadas à 37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e cada orifício tratado com diferentes concentrações das substâncias teste. Após 24 horas o extrato foi substituído por 0,2 mL de meio Eagle contendo 20 mg de vermelho neutro/mL. A incorporação do Vermelho Neutro pelas células vivas foi verificada após 3 horas, incubadas a 37°C. O meio foi removido e as células lavadas com PBS. Após descarte, cada poço recebeu 0,2 mL da solução de ácido acético em etanol (1% ácido acético em etanol 50%). A placa foi agitada por 10 min e a leitura das DO foi realizada num espectrofotômetro Organon Teknika Reader 530 version 1.24, em 540 nm. Com os valores obtidos calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%).

3.1.3.2. Teste de Citotoxicidade pelo metodo de exclusão do Azul de Trypan

As células McCoy obtidas a partir do tapete de células de frascos com meio Eagle e já tripsinizadas foram primeiramente contadas em câmara de Neubauer nos quadrantes referentes à contagem de leucócitos. Após multiplicou-se o resultado contado na câmara por 2,5 obtendo-se o número de células/ μL da suspensão. A partir desse valor foi calculado o volume de células que iria ser utilizado para que as mesmas estivessem sempre cerca de 1×10^6 (concentração final dos testes).

Após a incubação com as substâncias testadas, misturou-se 100 μL da suspensão de células com 100 μL da solução de Azul de Trypan, por cinco minutos. Na câmara de Neubauer fez-se uma contagem de 100 células,

separando-se em células vivas de mortas (que incorporam o corante), as quais foram expressas em porcentagem.

As células vivas aparecem translúcidas e brilhantes na presença da solução de azul de Trypan, enquanto as células mortas apresentam-se com uma coloração roxa.

3.1.3.3. Teste do efeito da Melatonina

Neste experimento foi colocado em um tubo "ependorf" uma quantidade de suspensão células McCoy (de acordo com o ajuste de 1×10^6 final), em PBS, HRP ($1 \mu\text{M}$), IAA (2mM) e melatonina com concentração final 1mM, tendo um volume final de reação de $500 \mu\text{L}$. Em seguida esta solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após este período misturou-se $100 \mu\text{L}$ desta suspensão com $100 \mu\text{L}$ da solução de Azul de Trypan, homogeneizou-se e contou-se em câmara de Neubauer as porcentagens de células vivas e mortas.

3.1.3.4. Teste do efeito do Ácido Ascórbico

Neste experimento foi colocado em um tubo "ependorf" uma quantidade de suspensão células McCoy (de acordo com o ajuste de 1×10^6 final), solução em PBS, HRP ($1 \mu\text{M}$), IAA (2mM) e ácido ascórbico concentração final 10mM, tendo volume final de reação de $500 \mu\text{L}$ final. Em seguida esta solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após este período misturou-se $100 \mu\text{L}$ desta

solução com 100 μ L da solução de azul de Trypan, homogeneizou colocou em câmara de Neubauer.

3.1.3.5. Teste do efeito do efeito do borbulhamento de Nitrogênio e Oxigênio no meio

Neste experimento foi colocado em um tubo Falcon uma suspensão de células McCoy em PBS na concentração de 1×10^6 /mL, HRP (1 μ M final), IAA (0,5; 1,0 e 1,5mM), pelo borbulhamento de O₂ no meio ou, IAA (2 mM) pelo borbulhamento de nitrogênio no meio, num volume de 500 μ L final. Em seguida esta solução foi incubada em banho-maria a 37° C, borbulhando nitrogênio ou oxigênio por 1 hora. Após este período misturou-se 100 μ L desta solução com 100 μ L da solução de azul de Trypan, homogeneizou colocou em câmara de Neubauer e verificou-se a viabilidade das células pelo teste do Azul de Trypan.

3.1.3.6. Avaliação da apoptose e/ou necrose por citometria de fluxo

Células McCoy B (ATCC 1696) foram mantidas em meio Eagle. Após tripsinização (2mL de solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz), as células foram contadas em câmara de Neubauer contendo aproximadamente 1×10^5 células/mL. As células foram adicionadas em microplacas (96 orifícios) para cultura de tecido (Corning cód. 25860) juntamente com as substâncias a serem testadas (IAA 1mM e 2 mM ; HRP 1 μ M; nos meios Eagle/PBS) as quais foram incubadas a 37°C por 1 hora e por 5 horas.

Para avaliação de apoptose, as células em estudo foram submetidas à marcação com anexina V conjugada à FITC (BD Pharmigen, San Diego, EUA). A anexina V possui alta afinidade pelo fosfolípídeo de membrana fosfatidilserina, o qual é externalizado em fases precoces de apoptose.

Ademais, foram também marcadas com IP (BD Pharmigen, San Diego, EUA), que identifica estágios finais de apoptose e também necrose celular.

Após a incubação foram retirados 500 μ L de cada orifício teste contendo: IAA 1mM/ 2 mM ; HRP 1 μ M; nos meios Eagle/PBS) e para cada teste foram separados 2 tubos marcados com as iniciais A (anexina) IP (iodeto de propídio). Em cada tubo contendo os 500 μ L correspondentes ao teste, foram adicionados 2,5 mL de “*stain buffer*” e os tubos foram centrifugados por 5 minutos à 3500 rpm. Após a centrifugação, verteram-se os tubos descartando o sobrenadante. Foram adicionados 3 μ L de anexina aos tubos com a inicial A, e 6 μ L de iodeto de propídeo aos tubos com iniciais IP, os quais foram deixados em repouso por 5 minutos. Depois do tempo aguardado, foram adicionados 300 μ L de tampão para ressuspender os testes. Os tubos foram deixados sob proteção da luz por 15 min. Adicionou-se 400 μ L de tampão em cada tubo e foram então analisados por citometria de fluxo.

A análise dos resultados foi realizada usando o software “Cell Quest” em citômetro de fluxo FACS calibur (Becton Dickinson), possibilitando a classificação das células em: viáveis (Anexina V- FITC e PI negativa), apoptose inicial (anexina V- FITC positiva e PI negativa), apoptose avançada (Anexina V- FITC e PI positiva) e necróticas (Anexina V- FITC negativa e PI positiva).

3.1.3.7. Estudo do consumo de oxigênio

A mistura da reação contendo 1mM IAA, 1mM Etil Ester IAA, 0,5 mM HRP, e várias concentrações de esterase em 0,05M de tampão fosfato pH 5,5, foram monitoradas com eletrodo Clark- type (Yellow Spring Instruments 5300A) ligado a um gravador X-Y (EG & G, Princeton Applied Research).

3.1.3.8. Estudo cromatográfico líquido de alta performance (HPLC)

As reações continham 1mM IAA ou 1mM Etil Ester IAA, 0,5 mM HRP e/ou 3.0 U/mL esterase em 0,05 M tampão fosfato pH 5,5, as quais foram incubadas à 37°C, por 30 minutos. Então, uma alíquota de 20 µL foi injetada dentro do sistema HPLC (Waters 2690 Separation Module in line with a Waters 996 UV- Vis Detector set at 254 nm). As análises foram realizadas no modo isocrático utilizando coluna em fase reversa Luna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) e a fase móvel foi 75:25 água/acetoneitrila (fluxo 1.0mL/min).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da citotoxicidade para as células McCoy do sistema IAA/HRP pelo teste do Vermelho Neutro.

Utilizando a metodologia do teste para citotoxicidade do Vermelho Neutro, na **Figura 3**, foi realizado o controle basal de morte celular por incubação à 37°C durante uma hora com monitoração à cada 15 minutos a fim de padronizarmos o tempo de incubação dos testes que seriam realizados; como controles testamos também as células com três concentrações diferentes de IAA, tendo sido observado que somente na maior concentração (6,25mM) uma citotoxicidade de cerca de 25% de morte celular pode ser observada. Foi realizada o teste de validação do sistema com três concentrações de IAA adicionados de HRP (1µM), concluindo que o método foi eficientemente citotóxico para células McCoy.

Além disso, na **Figura 4**, para confirmarmos que a citotoxicidade do sistema IAA/HRP é dependente de ERO's (espécies reativas de oxigênio) utilizamos uma substância antioxidante, o ácido ascórbico (AA) que foi adicionado ao sistema IAA/HRP na concentração de 10mM. O teste está representado pela linha azul escura, mostrando que nas mesmas condições anteriores à adição de AA, a morte foi reduzida em aproximadamente 60% após a adição do AA. Quando adicionou-se catalase na concentração 100µM, nas mesmas concentrações utilizadas para testar o sistema, observou-se que o efeito protetor não foi eficiente como pode-se observar acompanhando a linha azul clara que fica quase sobreposta à linha verde que representa a citotoxicidade do sistema completo.

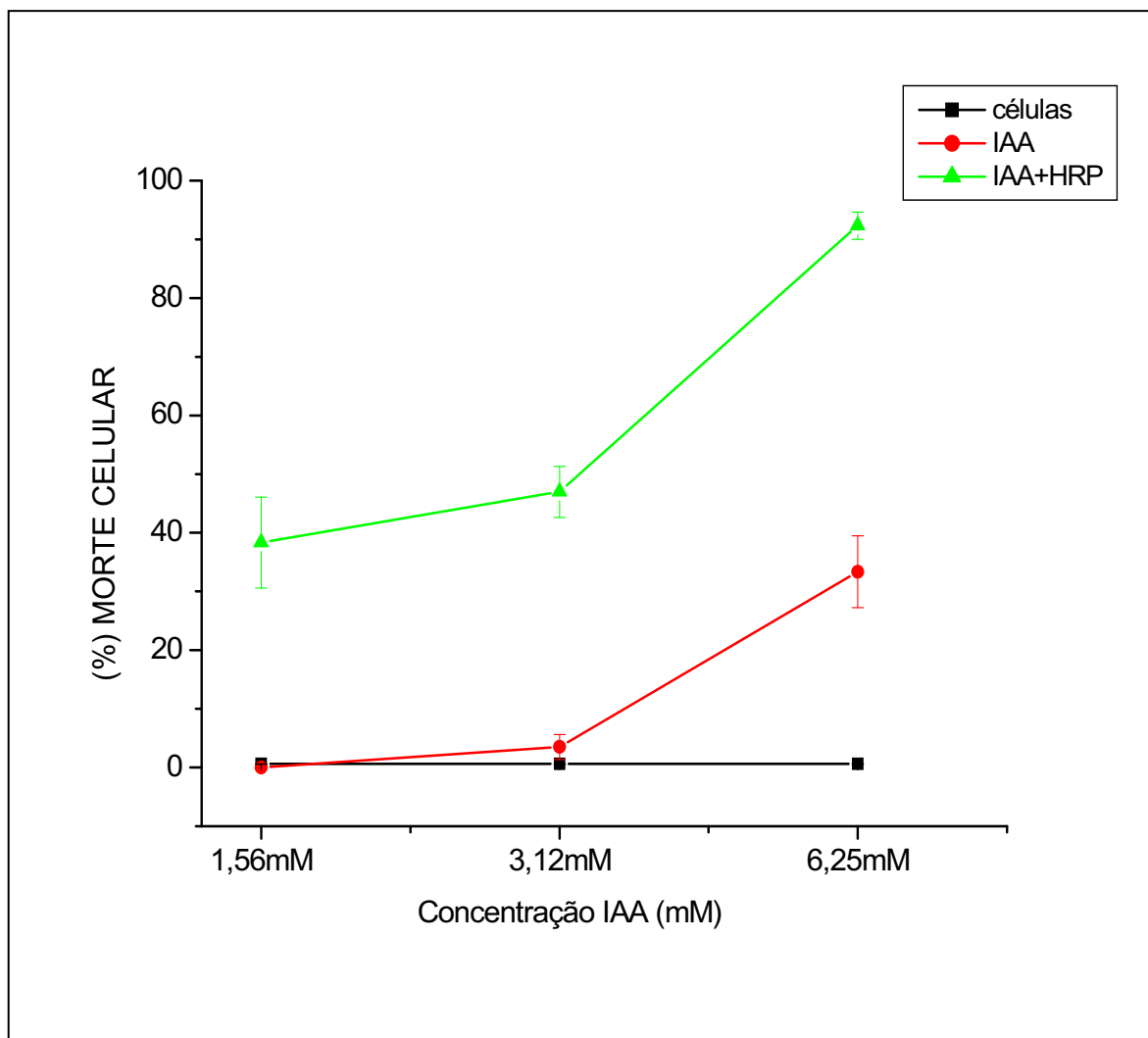


Figura 3. Efeito de indução de citotoxicidade pela associação IAA+HRP ($1\mu\text{M}$ final) em células McCoy ($6 \times 10^4/\text{mL}$), pelo método de Vermelho Neutro.

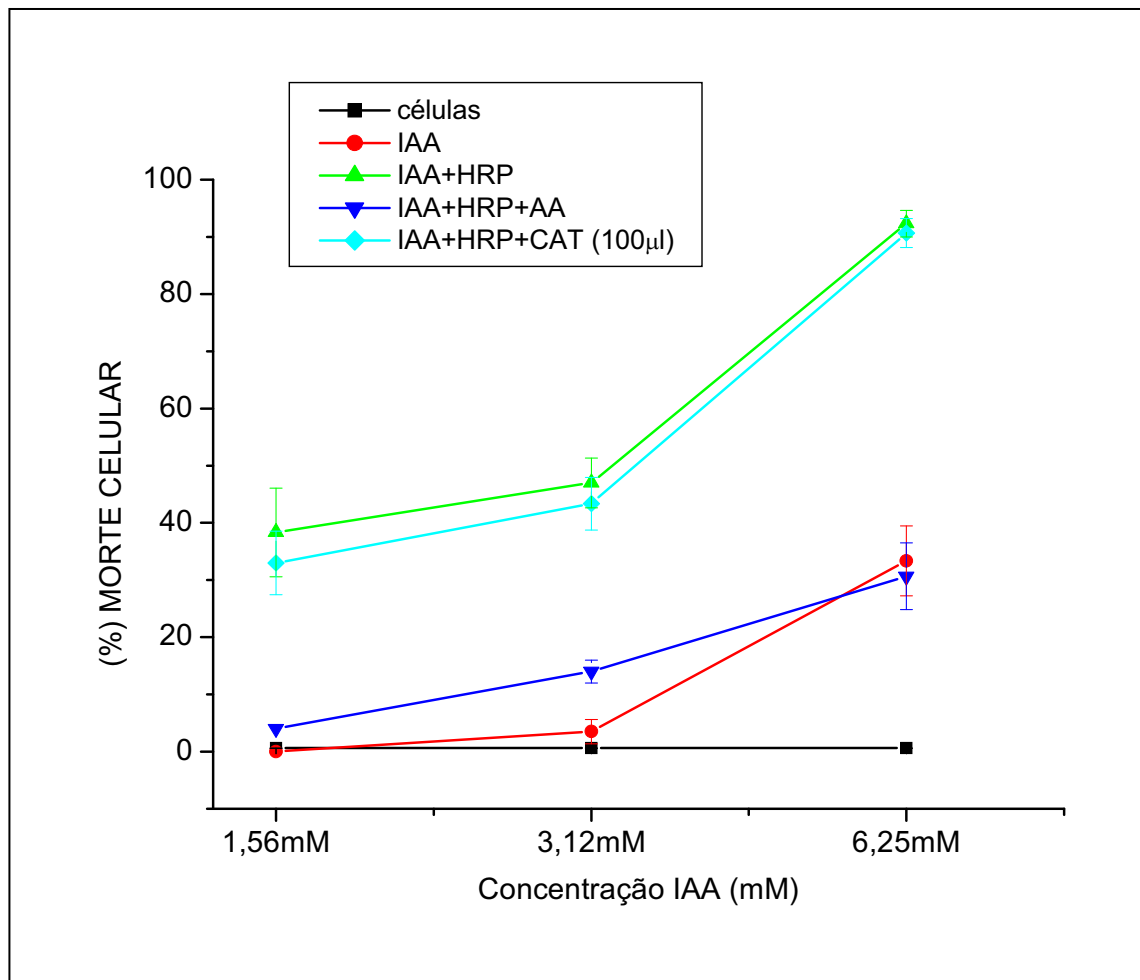


Figura 4. Avaliação dos efeitos protetores do AA (10mM) e catalase (100µL) no sistema IAA+ HRP (1µM final) em células McCoy (6×10^4 /mL), pelo método do Vermelho Neutro.

4.2 Avaliação da citotoxicidade para as células McCoy do sistema IAA/HRP pelo teste do Azul de Trypan

Previamente a todos os testes foi feita uma contagem inicial das células McCoy viáveis, utilizando-se o Azul de Trypan. A porcentagem de células vivas foi sempre superior a 97%. A incubação das células isoladamente a 37°C em PBS, provoca uma morte celular não superior a 15% após 1 hora (**Figura 5**). Experimentos de índice de viabilidade com o teste do Vermelho Neutro mostraram resultados comparáveis com o teste de exclusão do Azul de Trypan padronizado em testes preliminares e, por isso, optamos por esse último, por ser mais rápido e prático, na seqüência dos experimentos. Esse procedimento também facilitou a execução dos testes realizados em aerobiose e anaerobiose.

Na **Figura 6**, utilizando o ensaio de exclusão do Azul de Trypan, foi realizado o estudo da citotoxicidade do sistema IAA/HRP, em quatro concentrações de IAA: 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mM com HRP (1 μ M), comprovando a eficácia do sistema com aproximadamente 100% morte quando no ponto com IAA (2 mM) e HRP (1 μ M). Na inserção está demonstrado os controles com células e HRP (1 μ M); células com IAA (2mM), mostrando não serem citotóxicos quando sozinhos, e para provar o efeito citotóxico do sistema está o teste IAA (2mM) com HRP(1 μ M).

Os resultados não foram submetidos às delimitações dos estágios de apoptose pelo software Cell Quest, porque foi observado que as células utilizadas

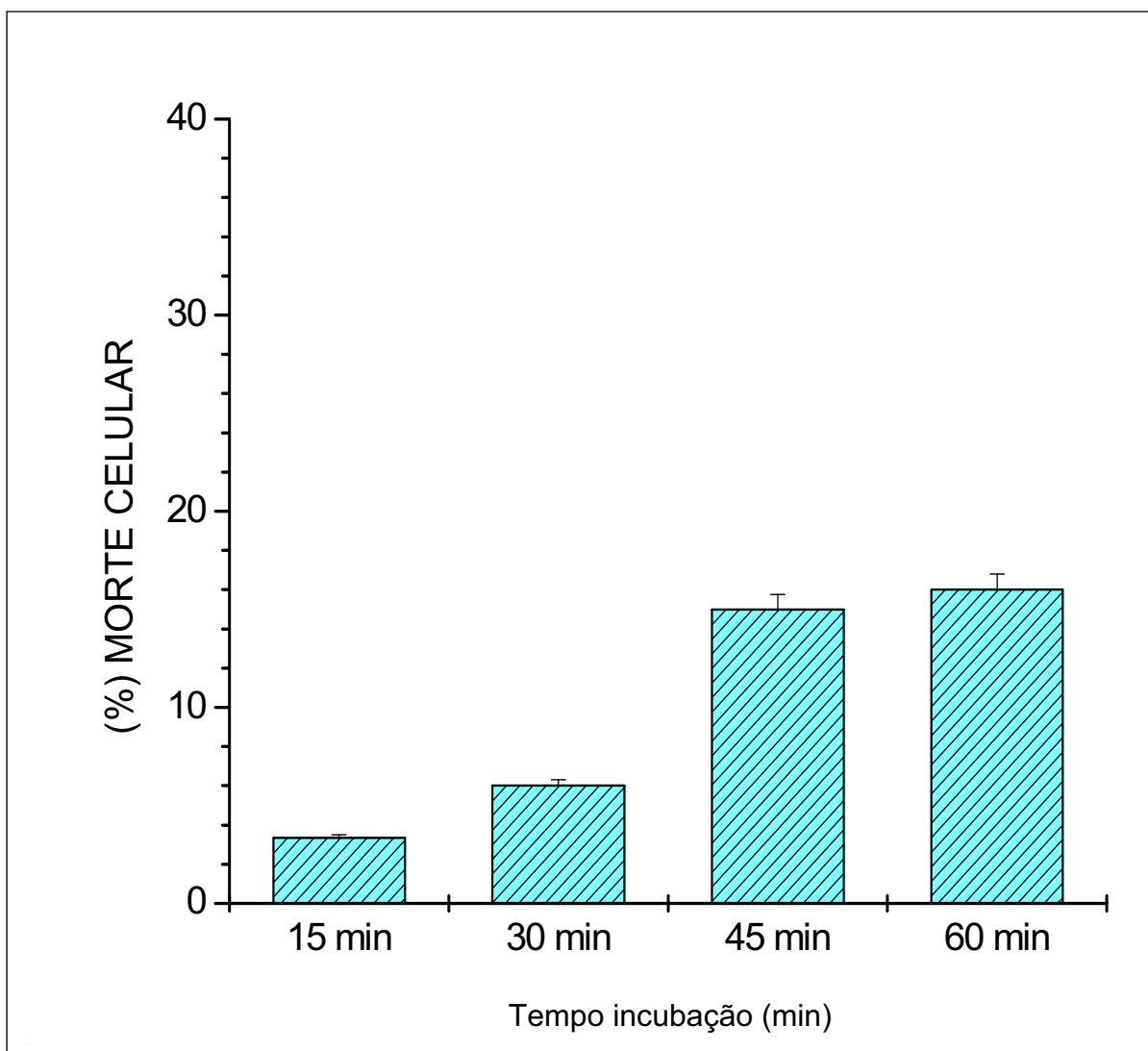


Figura 5. Percentagem de morte celular após 15, 30, 45 e 60 minutos de incubação em banho-maria (37°C). Células McCoy 1×10^6 /mL em um volume final de 500 μ L em PBS (média e desvio padrão de 3 experimentos realizados concomitantemente).

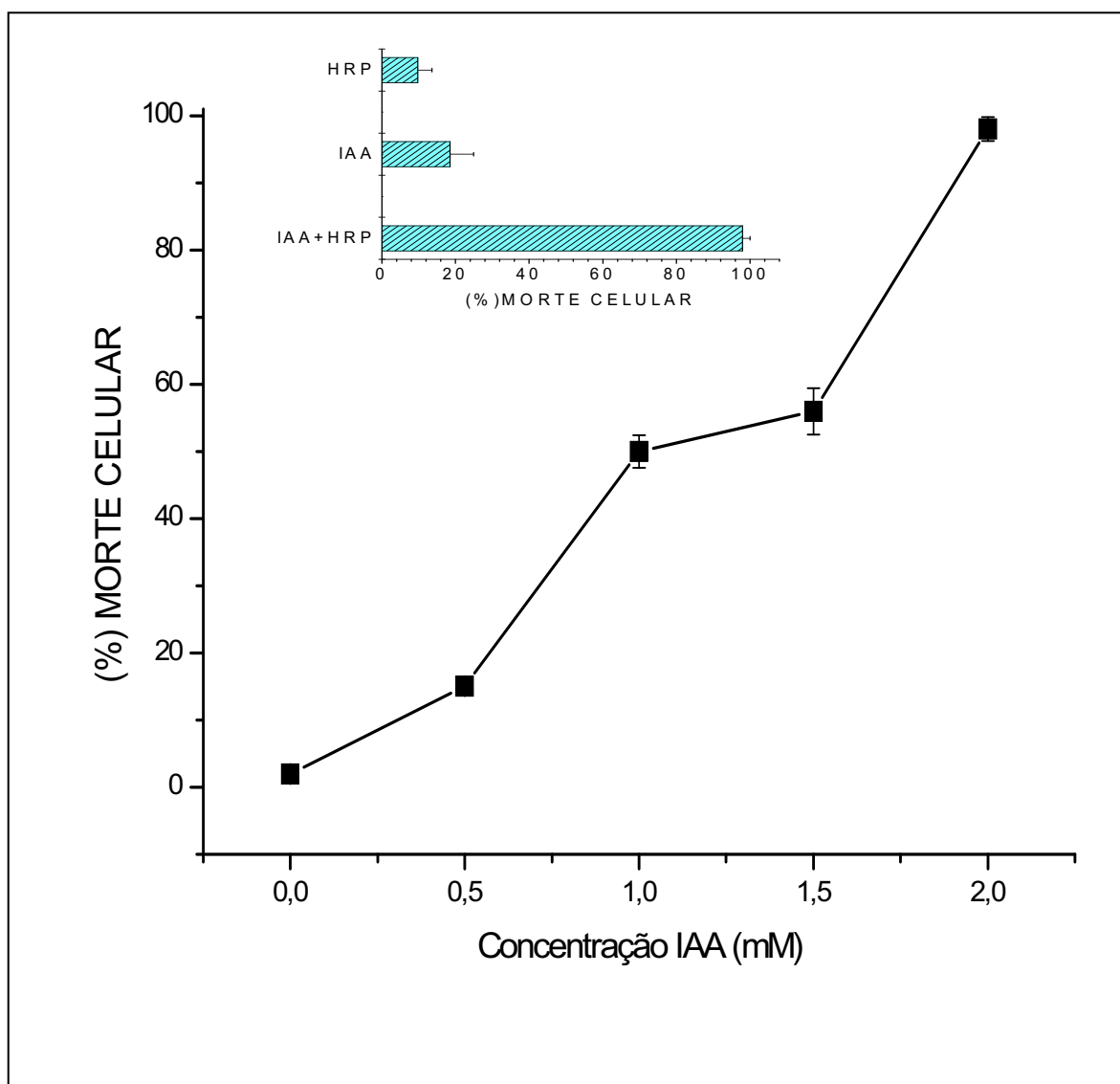


Figura 6. Citotoxicidade do par IAA/HRP nas células McCoy avaliadas no ensaio de exclusão do Azul de Trypan. Células McCoy (1×10^6 cels/mL), $1 \mu\text{M}$. HRP. Os resultados foram obtidos da média e desvio padrão das triplicatas (Inserção) Controles com 2mM IAA ou $1\mu\text{M}$ HRP contra sistema completo.

Como no teste com Vermelho Neutro observamos um efeito inibidor de um antioxidante exógeno (AA), avaliamos no teste com o Azul de Trypan um poderoso antioxidante endógeno, a melatonina, que na concentração de 1mM se mostrou eficiente na proteção das células McCoy frente ao sistema IAA/ HRP.

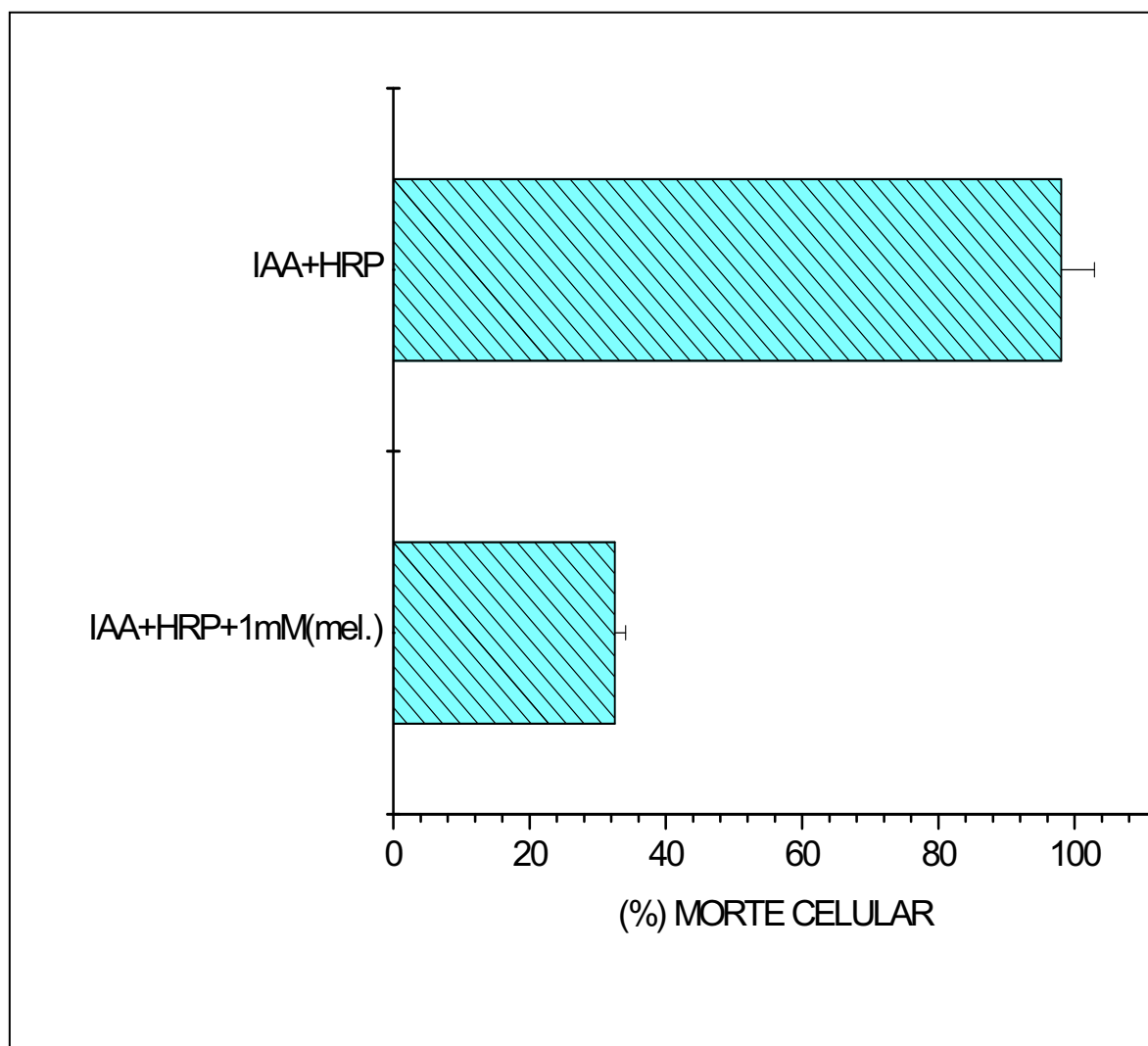


Figura 7. Estudo da concentração da melatonina como agente protetor da citotoxicidade das células McCoy (1×10^6 /mL) com IAA (2mM) + HRP (1μ M), pelo método de Azul de Trypan. Incubação a 37°C por 1 hora.

Na **Figura 8**, para também comprovar que o sistema é dependente de ERO's, realizamos o teste de anaerobiose pelo borbulhamento de Nitrogênio no tubo Falcon, contendo IAA (2mM) adicionado à HRP (1 μ M) e células McCoy; com a retirada de oxigênio da reação foi observada uma diminuição de morte.

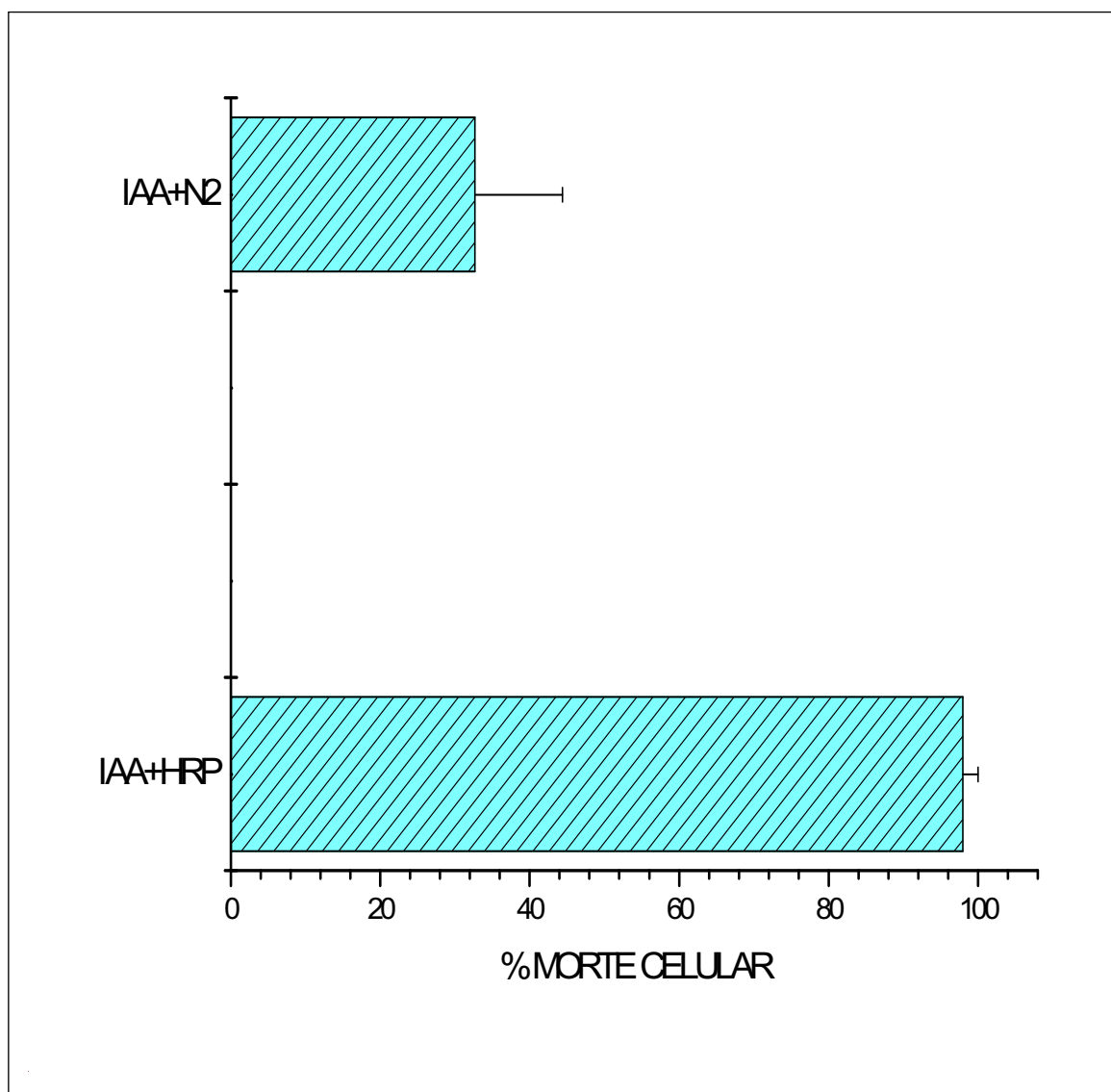


Figura 8. Efeito da anaerobiose na porcentagem de morte de células McCoy (1×10^6 /mL) com IAA (2mM) + HRP (1 μ M), pelo método de Azul de Trypan. Incubação a 37°C por 1 hora.

A confirmação de que o sistema IAA/HRP é induzido pela presença de ERO's, também pode ser confirmada no experimento de aeração do meio representado pela **Figura 9**, onde utilizamos as três menores concentrações de IAA adicionadas de HRP ($1\mu\text{M}$), onde não obtínhamos 100% de morte e comprovamos que, ao introduzir oxigênio através do borbulhamento aumentou-se a citotoxicidade.

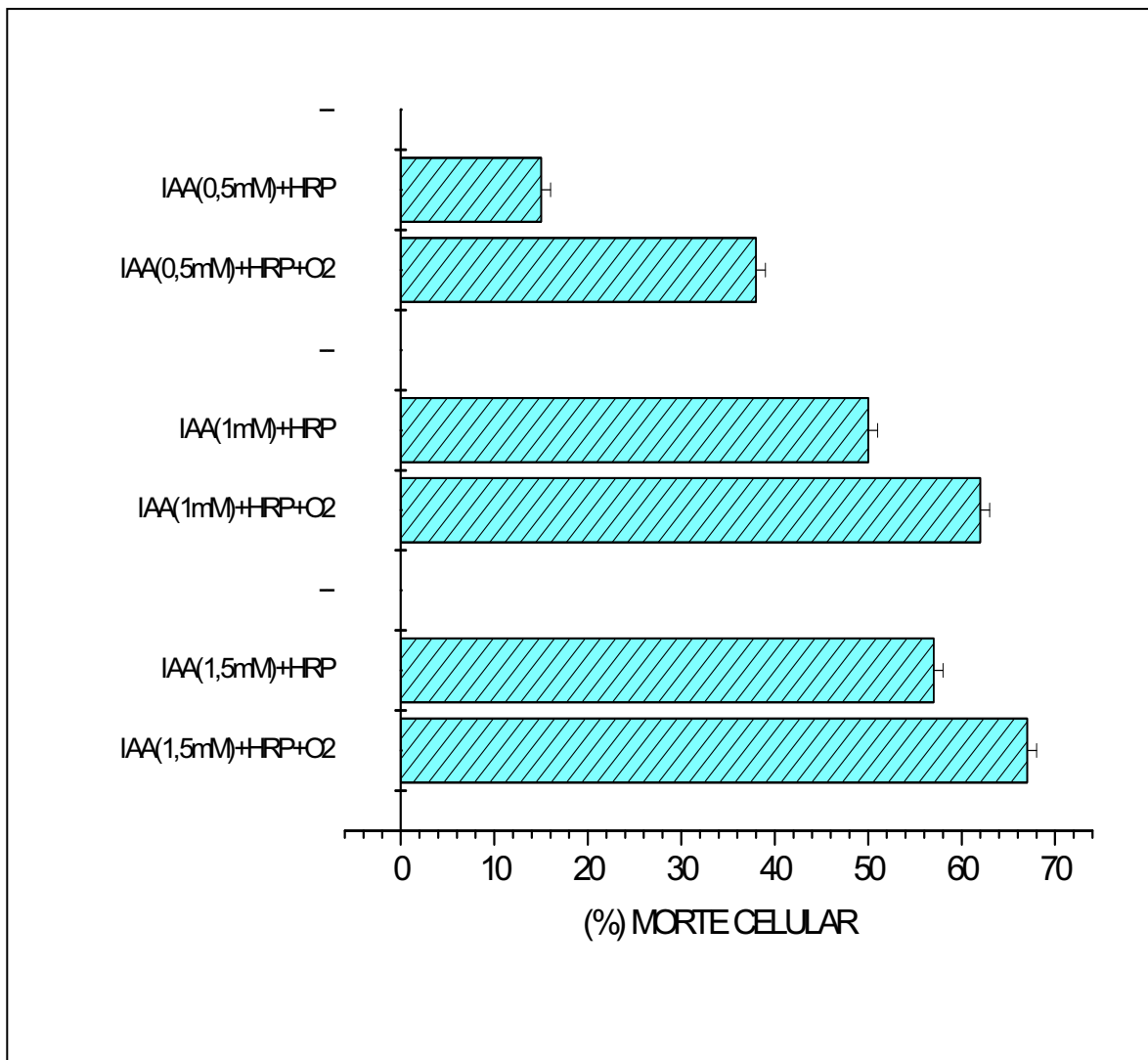


Figura 9. Aumento da citotoxicidade do sistema HRP ($1\mu\text{M}$) + IAA (0,5; 1,0 e 1,5mM), pelo borbulhamento de O_2 no meio, pelo método de Azul de Trypan. Incubação a 37°C por 1 hora.

A **Figura 10**, resume o achado da indução de morte celular pelo sistema IAA/HRP avaliada pelo método de Azul de Trypan; comprova que a enzima HRP ou o IAA isoladamente não são citotóxicos; e que melhor efeito protetor da citotoxicidade do sistema foi proporcionado pelo AA. Nos experimentos anaeróbicos, a mistura da reação foi deoxigenada com nitrogênio. Os resultados foram obtidos da média e desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. O Gráfico mostra que substâncias antioxidantes, como melatonina e ácido ascórbico, foram parcialmente capazes de diminuir a morte das células. Quando a mistura da reação foi feita anaeróbica, por borbulhamento de nitrogênio durante o curso da reação, a citotoxicidade do par IAA/HRP foi significativamente diminuída.

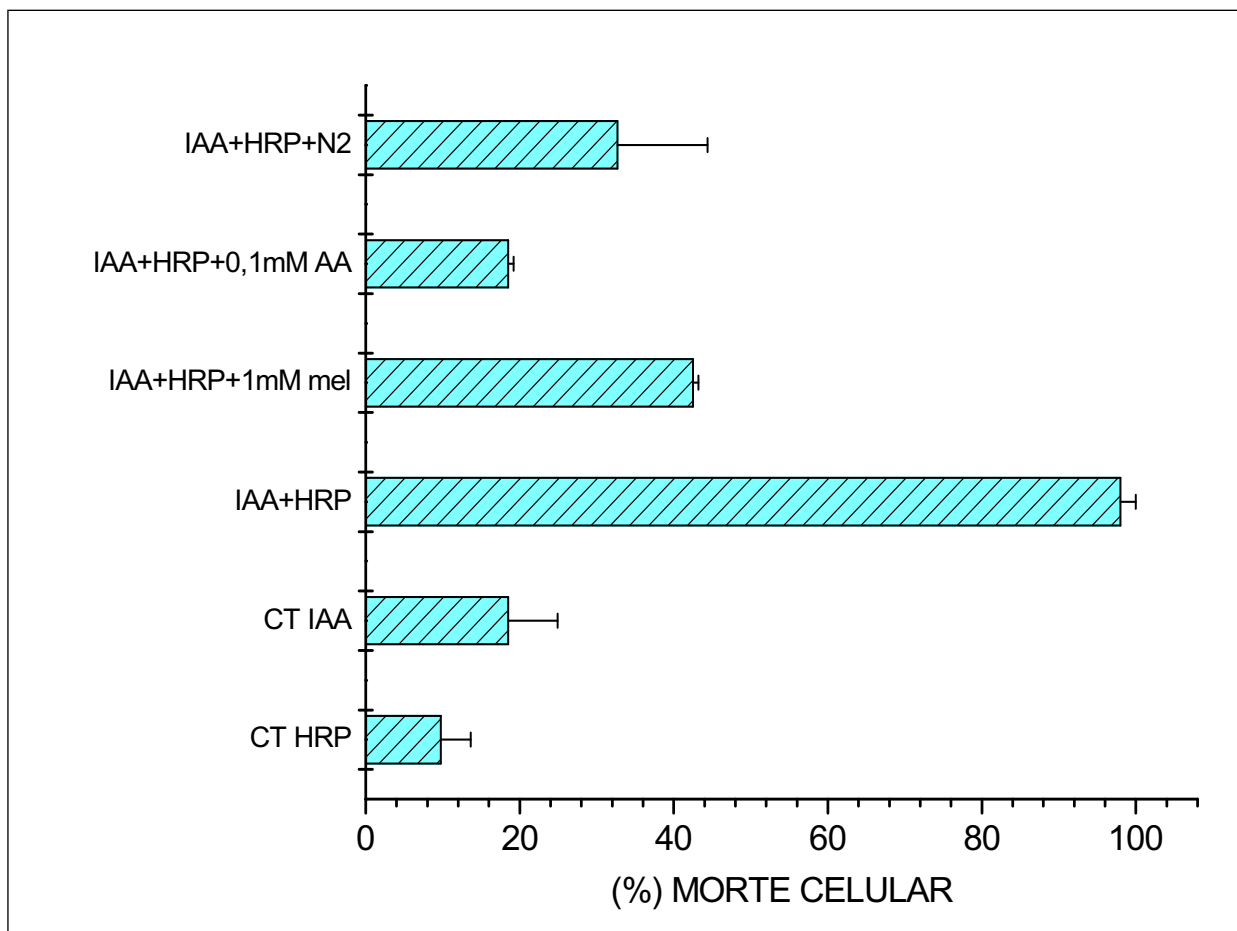


Figura 10. Efeito protetor de substâncias antioxidantes na indução de citotoxicidade pela associação IAA (2mM final) + HRP (1 μ M final) em células McCoy (1 $\times 10^6$ /mL). Volume final da reação = 500 μ L, pelo método de Azul de Trypan. Incubação a 37 $^{\circ}$ C por 1 hora. CT= só IAA, 2mM ou só HRP (1 μ M); Mel (1mM) e AA (10mM).

4.3. Análise estatística dos dados obtidos por citometria de fluxo.

Os estudos com citometria de fluxo comprovam em linhas gerais os resultados obtidos com as técnicas do Vermelho Neutro e Azul de Trypan. O sistema IAA/HRP, induz uma acelerada morte das células McCoy, predominantemente por necrose/e ou apoptose tardia, tanto em meio pobre, PBS (Figuras 11 e 12), como em meio rico, Eagle (Figura 13). Todavia neste último, resultados estatisticamente significativos de necrose foram observados apenas após 5 horas de incubação (Figura 13). Nas figuras 11, 12 e 13, foi realizada análise estatística somente com os dados obtidos nos testes com IAA (2mM) e HRP (1 μ M), devido à maior reprodutibilidade quando comparado com outra concentração testada. Foram também comparados os valores obtidos de morte por necrose do controle com necrose do teste e apoptose do controle com apoptose do teste.

Foi realizada a avaliação da necrose e apoptose das células McCoy após 1 hora de incubação em meio pobre (PBS), **Figura 11**, com IAA (2mM) e HRP (1 μ M); os dados foram obtidos após marcação com anexina ou Iodeto de propídeo (metodologia descrita no item 3.1.3.6). Foi observado que no controle a percentagem de morte por necrose, só pela exposição à incubação é de aproximadamente 20% o que evidencia o fato de que essas células em suspensão são frágeis, mas quando comparados os valores de morte por necrose do controle com os do teste obtêm-se aproximadamente 55% de morte com um $p < 0,001$.

Realizamos, na **Figura 12**, a avaliação da necrose e apoptose das células McCoy após 5 horas de incubação em meio pobre (PBS), com a adição de IAA

(2mM) e HRP (1 μ M); e a avaliação da apoptose e necrose dos controles só com células; os dados foram obtidos após marcação com anexina ou iodeto de propídeo (metodologia descrita no item 3.1.3.6). Observou-se que existe um aumento da porcentagem de morte celular nos controles devido ao maior tempo de incubação (5 horas), A porcentagem de morte por apoptose diminuiu no teste e isso se deve, provavelmente, ao fato de que estas células estariam já em apoptose tardia, e, quando adicionado o sistema IAA/HRP, elas migram para o quadrante das células em necrose.

Na **Figura 13**, podemos verificar a avaliação da necrose e apoptose das células McCoy após 5 horas de incubação em meio rico (Eagle), com a adição de IAA (2 mM) e HRP (1 μ M); e a avaliação da apoptose e necrose dos controles só com células; os dados foram obtidos após marcação com anexina ou iodeto de propídeo (metodologia descrita no item 3.1.3.6). Mesmo com o meio rico (Eagle) nos controles existe uma grande porcentagem de morte celular. Após a adição do sistema IAA/HRP é possível observar que a porcentagem de morte por apoptose diminuiu no teste e isso se deve ao fato de que estas células provavelmente estariam em apoptose tardia, e, quando adicionado o sistema IAA/HRP, elas migrariam para o quadrante das células em necrose.

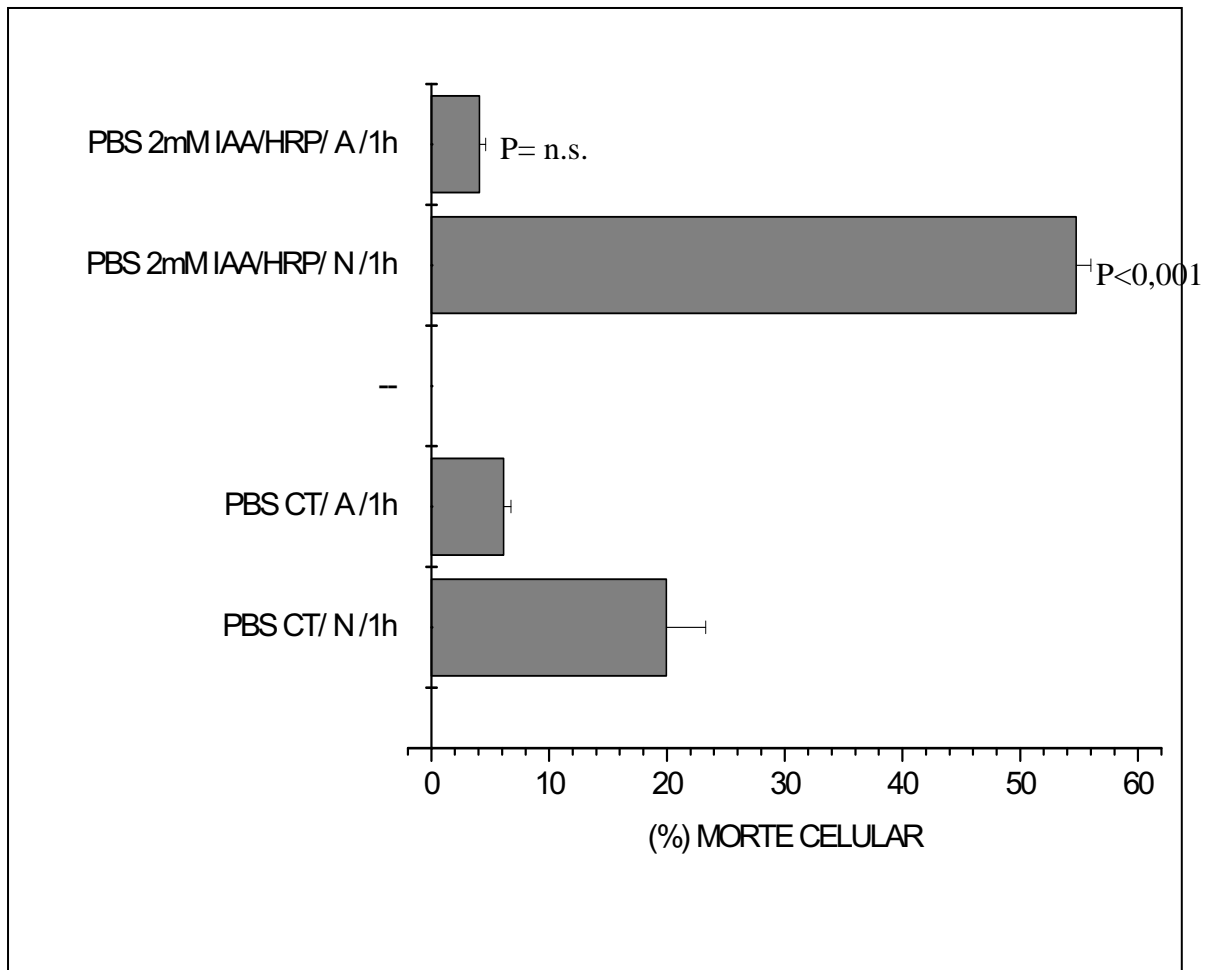


Figura 11. Citometria de fluxo: Necrose observada após 1 hora de incubação, em meio PBS: **N** = % células mortas por necrose; **A** = % células mortas por apoptose; CT= controle. Análise estatística: *test t Student* (teste vs controle) n.s = não significativo.

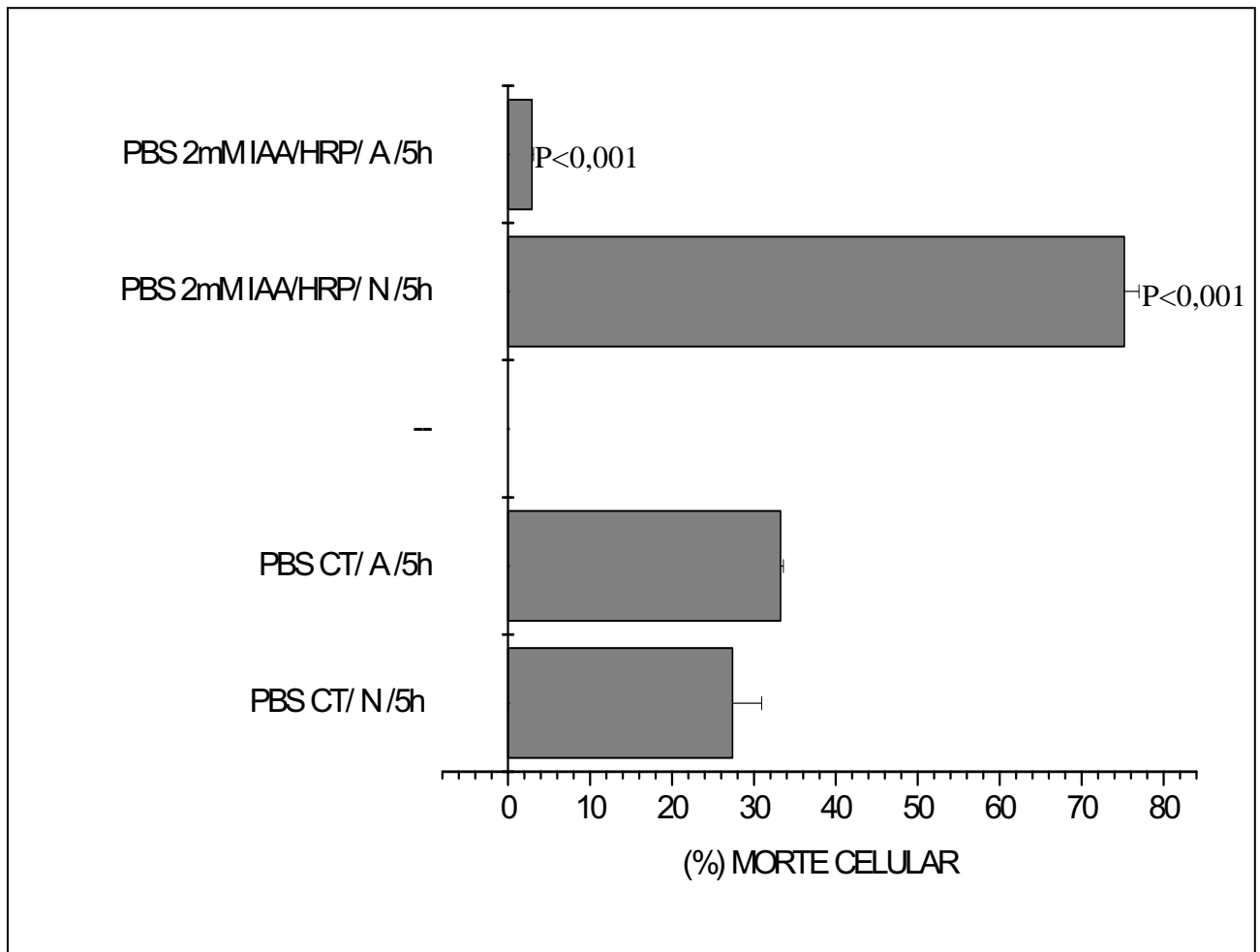


Figura 12. Citometria de fluxo: Necrose observada após 5 horas de incubação, em meio PBS: **N** = % células mortas por necrose; **A** = % células mortas por apoptose; CT= controle. Análise estatística: *test t Student* (teste vs controle).

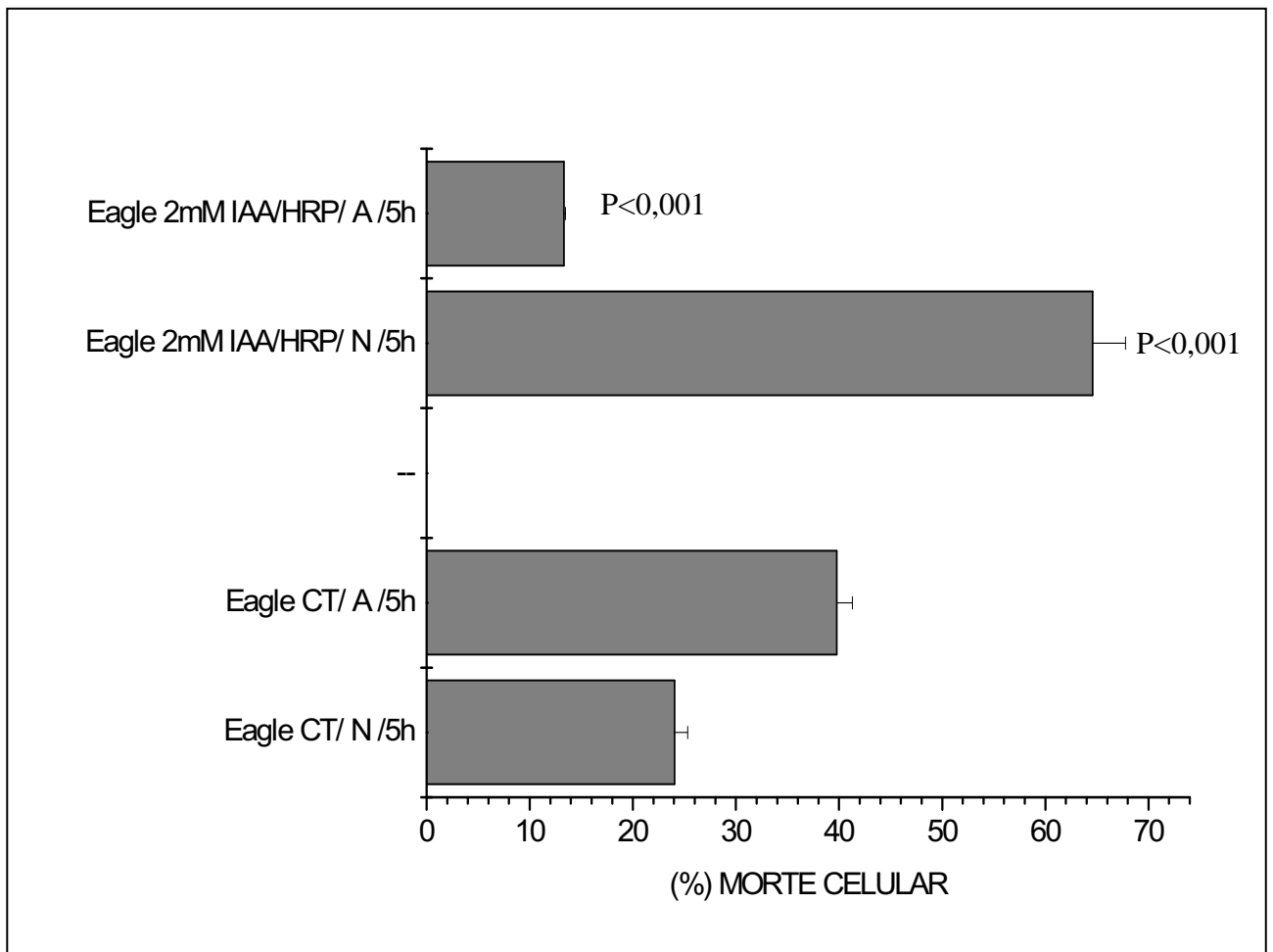


Figura 13. Citometria de fluxo: Necrose observada após 5 horas de incubação, em meio Eagle: **N** = % células mortas por necrose; **A** = % células mortas por apoptose; CT= controle. Análise estatística: *test t Student* (teste vs controle).

4.4. Utilização da tríade Etil ester IAA / esterase/ HRP como um modelo alternativo ao sistema IAA/HRP.

A ligação radicalar entre o escatoil e oxigênio explica o rápido consumo de oxigênio quando o IAA foi misturado com HRP (**Figura 14.A**).

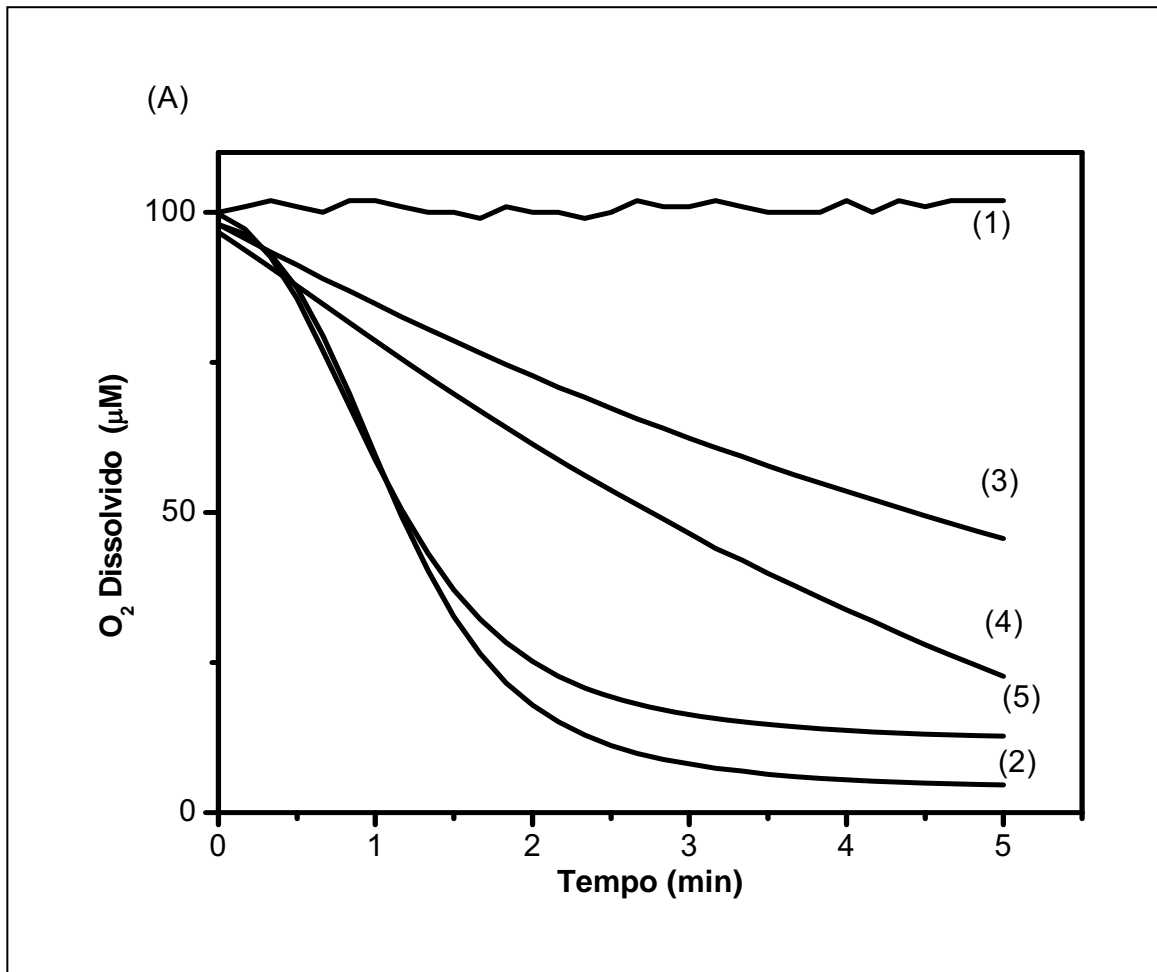


Figura 14 (A). Consumo de oxigênio provocado pela oxidação do IAA ou Etil ester IAA catalizado por HRP. O meio de reação era composto de 1 mM IAA, ou 1 mM Etil ester IAA; 0,5 μ M HRP e várias concentrações de esterase em 0,05 M tampão fosfato pH 5,5 à 37°C. O volume final era 3 mL. **(1)** Etil ester IAA e HRP, **(2)** IAA e HRP, **(3)** Etil ester IAA, 0,5 U/mL esterase e HRP, **(4)** Etil ester IAA, 1,5 U/mL esterase e HRP, **(5)** Etil ester IAA, 3,0 U/mL esterase e HRP.

As oxidações foram estudadas também no pH fisiológico. Embora a taxa relativa da reação para oxidação tenha diminuído, quando comparada ao pH 5,5, resultados similares foram obtidos no pH 7,4 (**Figura 14.B**).

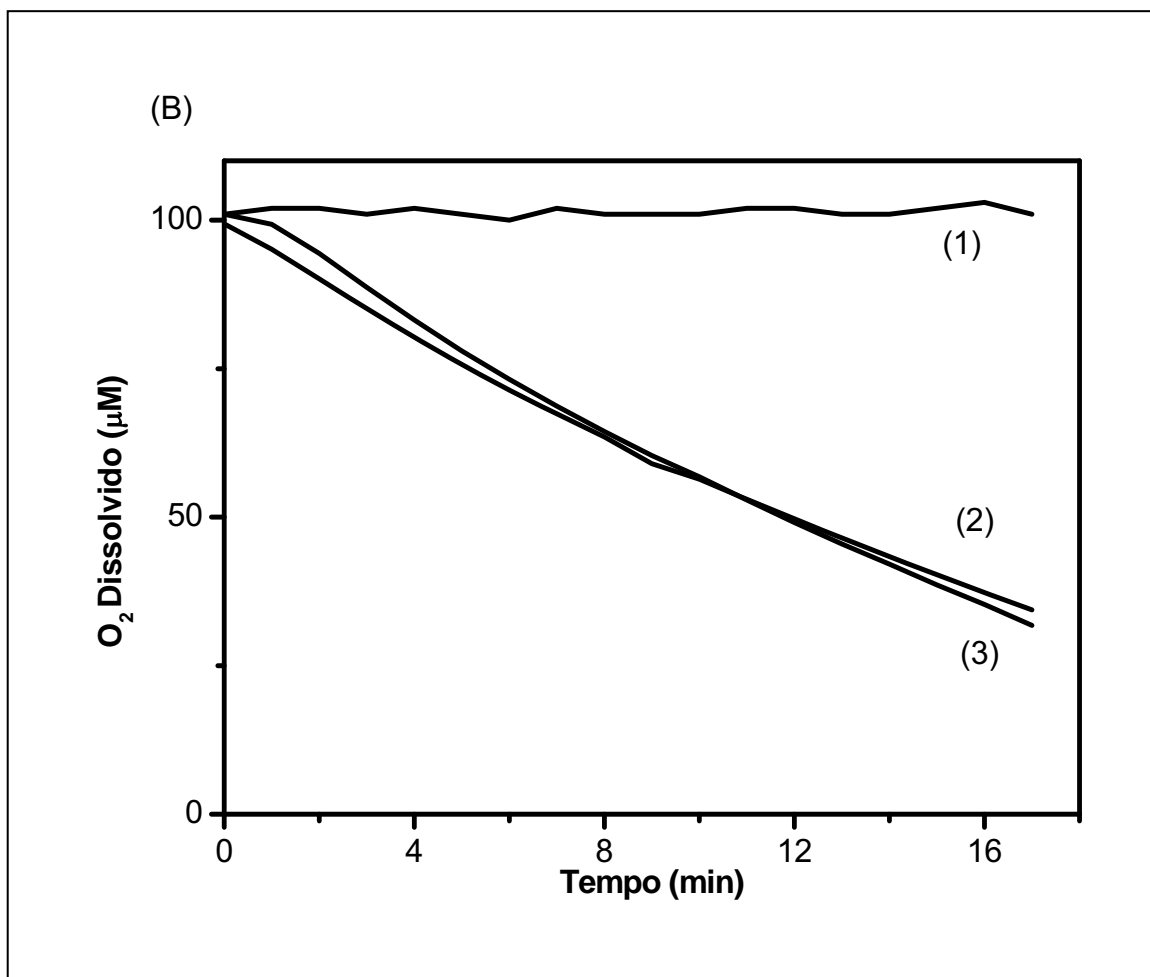


Figura 14 (B). Consumo de oxigênio provocada pela oxidação do IAA ou Etil ester IAA catalizada por HRP. Reações de pH 7,0. Etil ester IAA e HRP (1), IAA mais HRP (2) etil ester IAA mais HRP mais 3,0 U/mL esterase (3).

A HRP foi completamente inativa quando IAA foi substituído pelo seu derivado Etil ester. Entretanto, quando uma esterase foi adicionada na mistura da reação levando à hidrólise do Etil ester IAA para o precursor IAA, a oxidação toma seu curso natural.

A confirmação que a esterase foi catalizando a hidrólise do Etil ester IAA para IAA foi obtida pelo HPLC. O cromatograma representado na **(Figura 15)**, mostra o pico do IAA (A), o pico do Etil ester IAA (B), o pico do Etil ester IAA depois da hidrólise (C) e o pico obtido quando a mistura de reação contendo Etil ester IAA, esterase e HRP foi injetada (D).

A potente citotoxicidade do Etil ester do IAA na combinação com HRP acrescido de esterase, foi avaliada usando-se novamente a linhagem de células McCoy. Utilizando o ensaio de citotoxicidade do Vermelho Neutro e Azul de Trypan, observa-se citotoxicidade similar ao sistema IAA/HRP, anteriormente demonstrado **(Figuras 16 e 17)**.

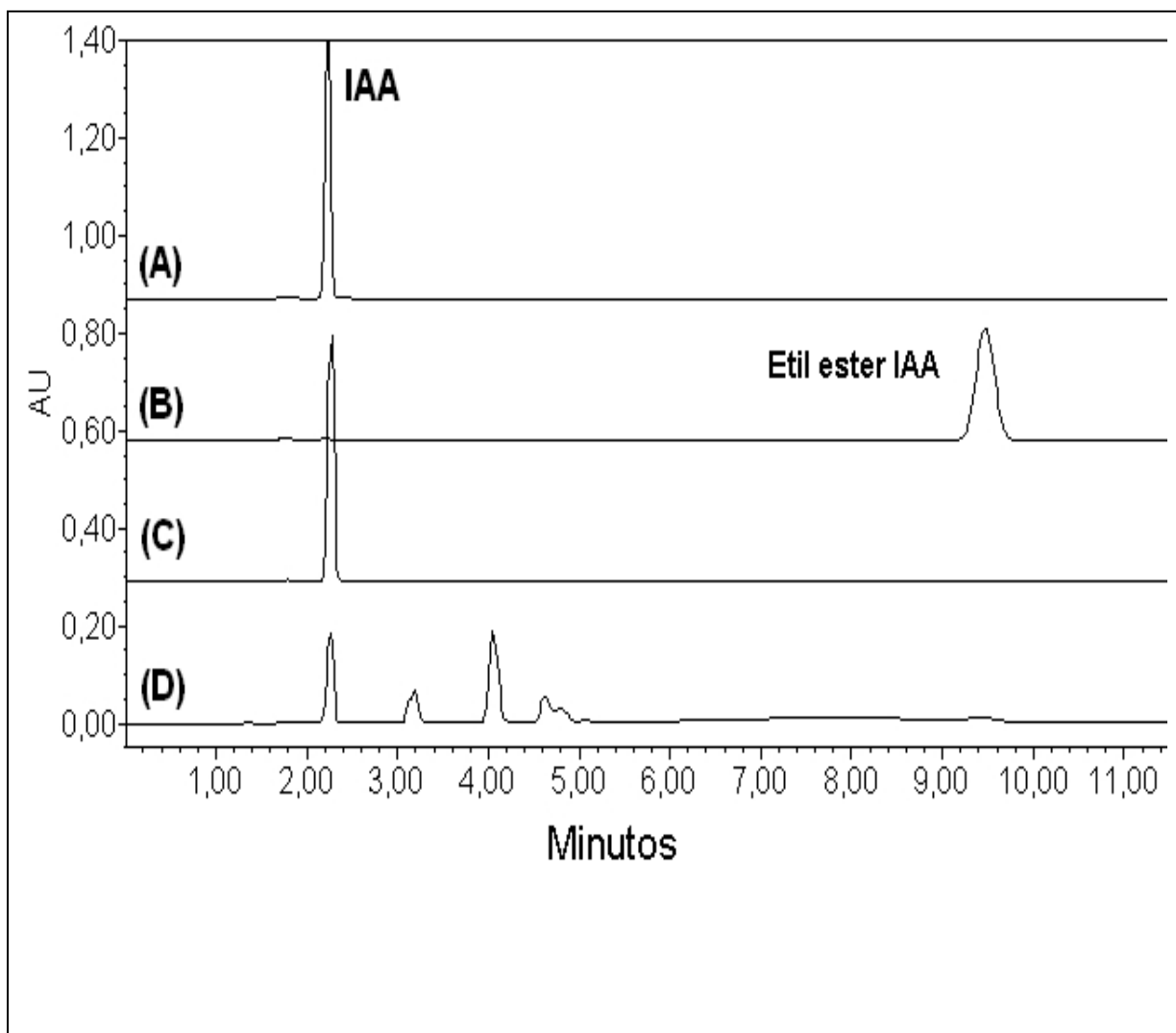


Figura 15. Perfil Cromatográfico de IAA e Etil ester IAA. 1 mM IAA ou 1 mM Etil ester IAA, 0,5 μ M HRP; 3,0 U/mL esterase em 0,05 M tampão fosfato pH 5.5 à 37°C. A mistura da reação (20 μ l) foi injetada depois de 1 hora do início da reação. Pico do IAA (A), pico do Etil ester IAA (B), pico do Etil ester IAA depois da hidrólise catalisada por esterase (C) e o pico depois da oxidação da hidrólise do Etil ester IAA pelo HRP (D).

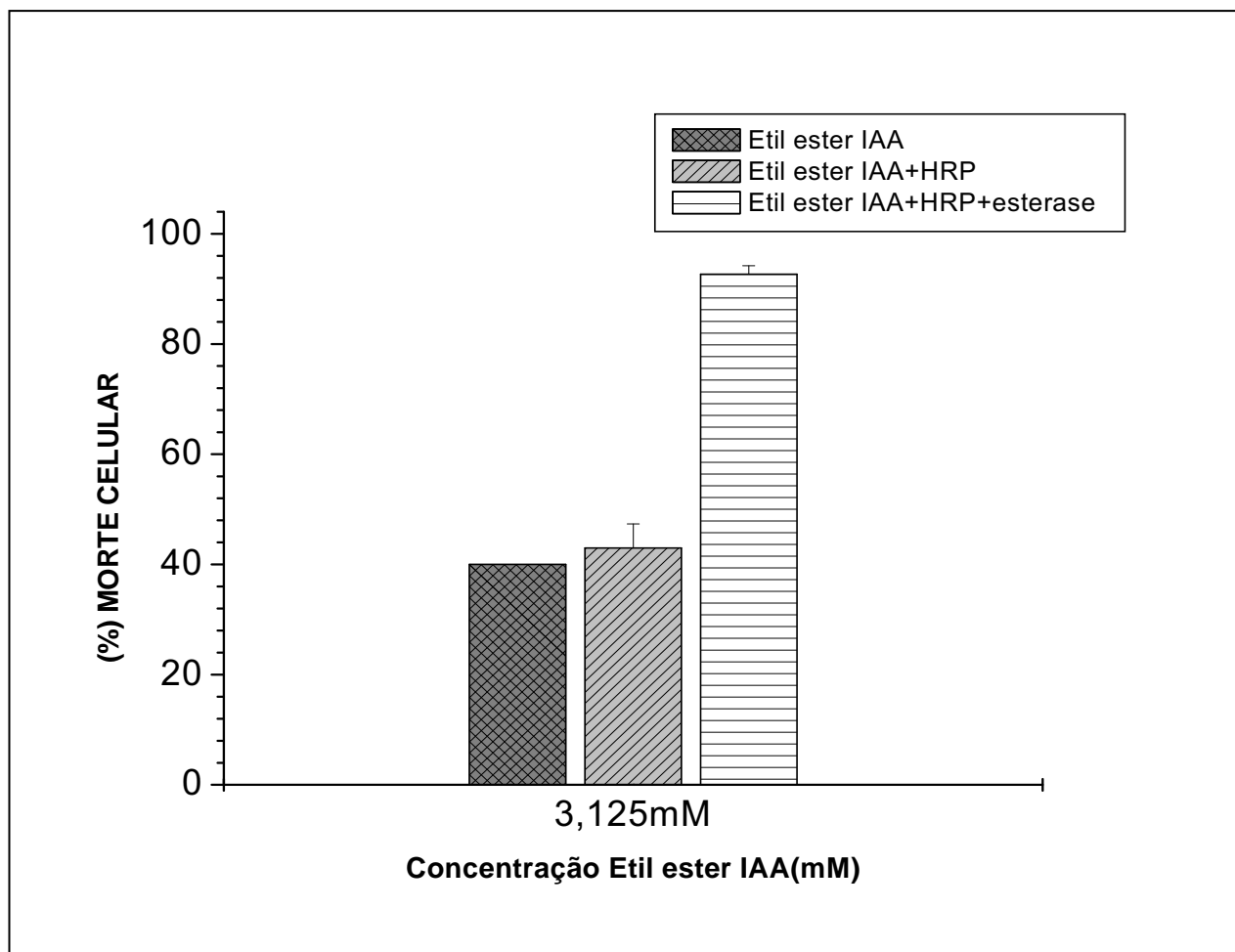


Figura 16. Avaliação do potencial do Etil ester do IAA na concentração 3,125Mm+esterase (5U/mL)+ HRP (1 μ M) como um sistema alternativo ao modelo IAA/HRP, pelo método de Vermelho Neutro.

Esta é mais uma evidência da geração de radicais peroxil. Como esperado, considerando a carência de reatividade entre HRP e o Etil ester IAA, este par enzima/pró-droga foi significativamente menos citotóxico na ausência de esterase (**Figura 17**).

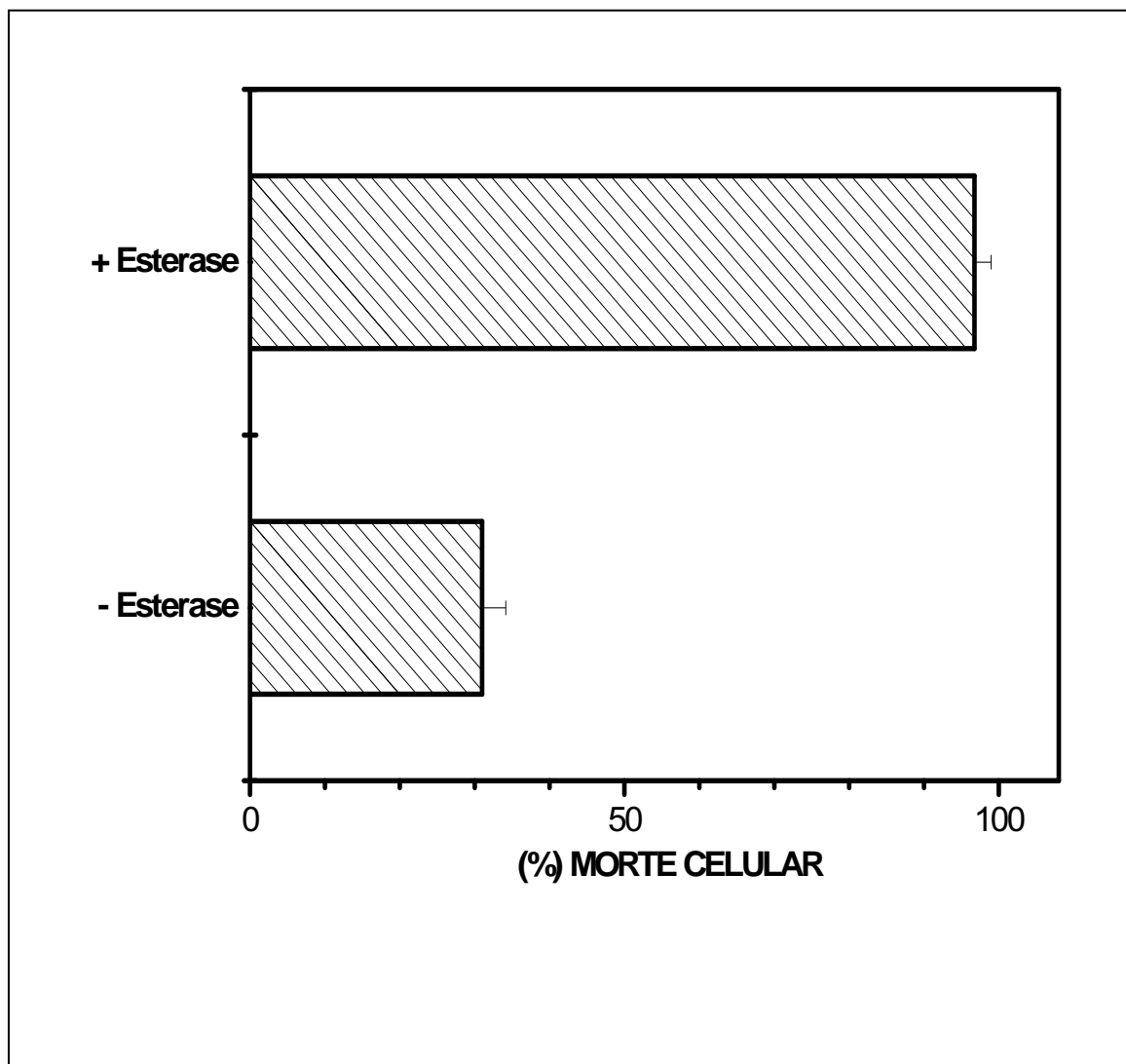


Figura 17. Citotoxicidade da tríade Etil ester IAA/esterase/ HRP nas células McCoy avaliadas no ensaio do Azul de Trypan. Células McCoy (1×10^6 cels/mL), 2 mM Etil ester IAA, 1 μ M HRP, 5 U/mL esterase. Os resultados foram obtidos da média e desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

5. DISCUSSÃO

O IAA é um hormônio de planta que regula o crescimento e desenvolvimento de plantas. O IAA é também um catabólito do triptofano, com níveis micromolares no plasma humano. Doses de IAA de 100 μ g/kg de peso foram administradas em seres humanos em estudos pioneiros, com outro propósito, observando-se alguma redução nos níveis sanguíneos de glicose, sem outras alterações fisiológicas notáveis (MIRSKY; DIENGOTT., 1956). Estudos recentes sugerem que o IAA, quando oxidado pela HRP sem a participação do peróxido de hidrogênio, produz compostos citotóxicos que poderiam ser usados como base para um novo modelo de terapia para tumores malignos. Os mecanismos de citotoxicidade relatados na literatura indicam uma variedade de moléculas e processos que poderiam induzir a morte de alguns tipos de células alvo estudadas. Assim a primeira hipótese aventada foi a possibilidade da peroxidação lipídica da membrana destas células (CANDEIAS et al., 1995).

Todavia, estudos subseqüentes em sistemas celulares sugeriram que essa via não seria a mais importante, (FOLKES; WARDMAN., 2001) sendo propostos outras citotoxinas como o MOI, 3-metileno-2-oxindol, (Figura 2, 10), e mesmo o peróxido de hidrogênio (KIM et al., 2006). Uma evidência concreta nos experimentos desenvolvidos é a de que cada linhagem celular neoplásica ou normal, possui uma susceptibilidade bastante variável frente ao sistema IAA/HRP.(KIM et al., 2004; HUANG et al., 2005; TUPPER et al., 2004; FOLKES, WARDMAN., 2001).

Para testarmos algumas dessas hipóteses em particular o envolvimento de radicais livres formados na reação IAA/HRP (Figura 2), nós utilizamos a linhagem de células McCoy (fibroblastos neoplásicos transformados) (ATCC CRL-1696).

Métodos *in vitro* que medem o potencial citotóxico de drogas, foram introduzidos na década de 80 e continuam sendo largamente utilizados. Em geral células são expostas a diferentes concentrações da substância ou substâncias teste por um período de tempo e, posteriormente, o grau de inibição, de viabilidade e/ou condições funcionais das células são avaliados.

A sistemática de avaliação dessa viabilidade celular deve, evidentemente, iniciar-se por procedimentos mais incisivos e, se nenhuma evidência de citotoxicidade direta for observada, métodos mais refinados devem ser adotados. Entre as metodologias que avaliam a viabilidade celular diretamente estão as técnicas com corantes vitais como o Azul de Trypan que tem a capacidade de penetrar somente em células mortas que tiveram a integridade funcional da sua membrana destruída. Também muito utilizado nesse contexto é o método da captação do Vermelho Neutro o qual é ativamente absorvido pelas células vivas por pinocitose ou transporte ativo através da membrana plasmática íntegra e acumula-se apenas nos lisossomos de células vivas (BARILE., 1994).

A avaliação do sistema IAA/HRP para as células McCoy, por essas duas técnicas com corantes vitais evidenciam efeito citotóxico significativo em concentração de 1 e 6 mM de IAA acrescido de 1 μ M de HRP (Figuras 3 e 6). A principal informação desses resultados é de que o sistema IAA/HRP altera a viabilidade da célula McCoy por ação direta na integridade funcional da sua membrana celular, de acordo com os mecanismos de ação descritos no parágrafo anterior.

Quando uma célula sofre grave lesão que compromete sua viabilidade, ela pode ser destruída por falência dos seus múltiplos sistemas, em especial se a

integridade da membrana celular for afetada. A esse processo de morte celular é reservada a denominação de necrose. Já a apoptose, a morte celular programada, permite a eliminação de células que perderam a função ou que vão ser substituídas por outras, ou ainda que sofreram lesões *sutis* que impedem a sua viabilidade. Em contraste com a necrose, a apoptose é um mecanismo ativo, que envolve a ação coordenada de genes pró- apoptóticos e ativação de uma cadeia de enzimas (caspases) que degradam o DNA (GORICOCHEA; ZAGO., 2004).

Utilizando-se uma metodologia mais refinada, a citometria de fluxo, que permite distinguir, com precisão, o processo de morte envolvida no experimento, pudemos confirmar de forma inequívoca, a total predominância da indução de necrose celular nas células McCoy quando submetidas ao sistema IAA/HRP, tanto em meio pobre (PBS) como em meio rico (Eagle), (Figuras 11,12 e 13), período em que a única diferença observada é que em meio rico as células demoram mais para serem destruídas, à exemplo do que ocorreu com o teste do Vermelho Neutro, onde em meio Eagle houve a necessidade de uma maior concentração do IAA para se observar a morte celular mais eficiente. Evidentemente, nos dois casos, as melhores condições propiciadas pelo meio rico protegem parcialmente as células, da citotoxicidade do sistema IAA/HRP.

As figuras 11, 12 e 13 provam que este sistema IAA/HRP quando testado para células McCoy, induz à morte celular por necrose. As barras que representariam os valores obtidos por apoptose provavelmente estão inseridos no quadrante referente à apoptose tardia. Como no nosso experimento as células McCoy se mostraram muito sensíveis a este sistema, não foi utilizado o *software*

Cell Quest que classificaria a morte celular em três estágios (apoptose inicial, tardia e necrose), onde, certamente, as células mortas estariam no quadrante de células mortas por apoptose tardia, explicando o fato de encontrarmos nas figuras de barras os controles com percentagens de apoptose maiores que as dos testes pois, depois da adição do sistema IAA/HRP, as células migraram do quadrante de apoptose para o de necrose.

O mecanismo da citotoxicidade do sistema IAA/HRP é controverso. Observando-se a Figura 2, um passo importante na formação de produtos pela reação enzimática, é a produção de radical livre centrado em carbono como o escatoil, e um radical livre de oxigênio, o peroxil. Evidentemente os primeiros candidatos à ação citotóxica, foram esses radicais, principalmente o peroxil já que essas espécies reativas de oxigênio são elementos bastante conhecidos como promotores de peroxidação lipídica e portanto indutores da destruição da camada bilipídica das membranas de células alvo. De fato, experimentos iniciais evidenciaram que o sistema IAA/HRP induzia a peroxidação lipídica em um modelo utilizando lipossomos como alvo (CANDEIAS et al., 1995; CANDEIAS et al., 1996). Estudo subsequente, todavia, não conseguiu evidenciar peroxidação lipídica significativa em duas linhagens de células neoplásicas: MCF-7 e HT29 (FOLKES; WARDMAN., 2001).

O mesmo grupo de pesquisa que chegou a esses resultados propôs outro mecanismo citotóxico: a reação do produto MOI com compostos celulares nucleofílicos como tióis levando à formação de tio-ésteres citotóxicos (FOLKES; ROSSITER; WARDMAN., 2002).

Nossos resultados todavia, indicam fortemente para uma lesão de membrana nas células McCoy com subsequente necrose como indicam os testes com os corantes vitais e a citometria de fluxo. O ataque à membrana dos produtos radicalares da reação IAA/HRP parece ser o mecanismo mais óbvio quando verificamos os diferentes passos dessa reação. Para confirmarmos essa hipótese submetemos o sistema IAA/HRP/células McCoy a dois tipos de antioxidantes: um exógeno, o AA; e um endógeno, a melatonina. O AA reduz em cerca de 70% a morte celular avaliada pelo teste do Vermelho Neutro e 80% no teste do Azul de Trypan. A melatonina reduz em cerca de 60% a morte das células McCoy no teste de Azul de Trypan (Figuras 3,4 e 7). Além disso, a indução de anaerobiose no meio da reação, pelo borbulhamento de N₂ também reduz a percentagem de morte celular em cerca de 60% (Figura 8 e 10). Ao contrário, o borbulhamento de O₂ no meio favorece o processo de citotoxicidade (Figura 9).

Relatos mais recentes da literatura, usando como células alvo neutrófilos, linfócitos (MELO et al., 2004) e hepatócitos de rato (TAFAZOLI; O'BRIEN., 2004) também evidenciaram lesão de membrana nas células alvo, bem como o processo de peroxidação lipídica foi detectado. As diferenças observadas nesses relatos podem estar relacionadas com os procedimentos metodológicos. As investigações que não obtiveram evidências de lesão de membrana, a morte celular detectada foi predominantemente por apoptose, verificada após um tempo prolongado de incubação (acima de 6 horas) e, as concentrações do IAA inferiores a 0,5 mM. É muito provável que em baixas concentrações de IAA o mecanismo de morte celular seja muito mais sutil e demorado. Nós realizamos experimento com citometria de fluxo em baixas concentrações de IAA (< 500mM),

porém, após 12 horas de incubação mesmo as células controle atingiam 100% de morte, indicando uma baixa viabilidade das células McCoy em suspensão, mesmo em meio rico (Eagle). Todavia, a baixa dosagem do IAA não seria um fator limitante, caso essa droga, em conjunto com o HRP, venha a ser utilizada em técnicas de tratamento a tumores malignos (como a técnica ADEPT, por exemplo), uma vez que esse composto possui uma toxicidade extremamente baixa (MIRSKY; DIENGOTT., 1956).

O peróxido de hidrogênio foi a última molécula a se tornar candidata como o veículo efetor da morte celular pelo sistema IAA/HRP (KIM et al., 2006). Utilizando células de G361, esses autores obtiveram evidências da formação de H_2O_2 quando as mesmas interagem como sistema IAA (0,5mM) + HRP(1 μ M). O peróxido de hidrogênio é uma molécula reconhecida como indutora de apoptose em uma grande variedade de tipos celulares (DAS; MUKHERJEE; SHAHA., 2001), embora outras espécies reativas de oxigênio também sejam indutoras desse tipo de morte celular (AKIYAMA et al., 2005). No nosso modelo, a ação do peróxido de hidrogênio na morte das células McCoy, aparentemente não desempenha um papel preponderante, uma vez que a utilização da catalase não diminuiu a eficiência citotóxica do sistema IAA/HRP (Figura 4).

Pelo que podemos depreender da somatória dos nossos dados com os da literatura é que o sistema IAA/HRP é um eficiente e promissor sistema citotóxico que atua por diferentes mecanismos induzindo células alvo, tumorais ou não, a necrose ou apoptose. O caminho a ser seguido, da morte celular, nos parece estar intimamente relacionado com a concentração do IAA empregada bem como o tipo de célula alvo escolhida como teste.

Considerando a alta especificidade da HRP pelo IAA, nós hipotetizamos que o seu Etil Ester (Etil Ester IAA), não seria reconhecido pela HRP, conseqüentemente, poderíamos disparar a geração de espécies citotóxicas com a colaboração de duas enzimas: uma esterase que quebraria o Etil Ester IAA em IAA e numa segunda etapa a conhecida ação da HRP sobre o IAA. Teríamos então uma aplicação potencial da tríade: Etil Ester IAA/ esterase/ HRP como uma nova estratégia para um procedimento do tipo ADEPT.

De fato, a especificidade da HRP para IAA, na ausência de H_2O_2 é realmente marcante haja visto que as peroxidases estão entre enzimas mais inespecíficas. A HRP pertence a uma classe de enzimas que usam peróxido de hidrogênio como um co-substrato para oxidar um grande número de fenóis, aminas aromáticas e derivados indóis (VEITCH et al., 2001). Outra importante peroxidase é a mieloperoxidase, que inclui aproximadamente 5% da proteína contida nos neutrófilos e é responsável pela produção de ácido hipocloroso bactericida quando estas células são ativadas (KLEBANOFF., 2005). Entretanto, só a HRP é capaz de catalizar a oxidação do IAA sem peróxido de hidrogênio (DUNFORD., 1999). Esta alta especificidade foi confirmada por nós com o Etil Ester IAA, que apesar de sua estrutural similaridade com IAA, não foi reconhecido como substrato da HRP (Figuras 14a e 14b). Uma explicação razoável para a falta de reatividade entre HRP e Etil Ester IAA é a impossibilidade da decarboxilação oxidativa. Este passo é responsável pela produção de hidroperóxido escatoil que é essencial na geração de espécies citotóxicas (GAZARIAN et al., 2000). A necessidade de decarboxilação oxidativa durante a geração de espécies citotóxicas mediada por IAA foi a base para nossa aplicação

do Etil Ester IAA como uma pró-droga potente. Montamos então um modelo experimental em que duas enzimas foram necessariamente disparadas para a geração de espécies citotóxicas o que poderá conferir um aperfeiçoamento da seletividade no local do tumor (Figuras 15, 16 e 17).

Certamente, alguém poderia argumentar que esterases estão em toda a parte nos mamíferos e, conseqüentemente, não seria adequado para estratégia do ADEPT. Entretanto, este é só um modelo, e este poderia ser avançado pela síntese de β - galactosídeos ou HRP e β - glucosidase, que também poderiam ser utilizadas na estratégia ADEPT (WANG et al., 2007; THOMAS et al., 2007). A **Figura 18**, mostra nossa proposta para uso de derivados de Ester de IAA como duas enzimas dependentes de pró-drogas para estratégia ADEPT.

Outra poderosa aplicação do Etil Ester IAA está ligada a sua alta lipossolubilidade, quando comparada com o IAA. Por exemplo, na estratégia GDEPT, onde células construídas poderiam expressar HRP (GRECO et al., 2002). Neste caso, depois da difusão do Etil Ester IAA para o meio intracelular, esterases endógenas poderiam hidrolizar o substrato, liberando IAA para HRP expressa *in situ*.

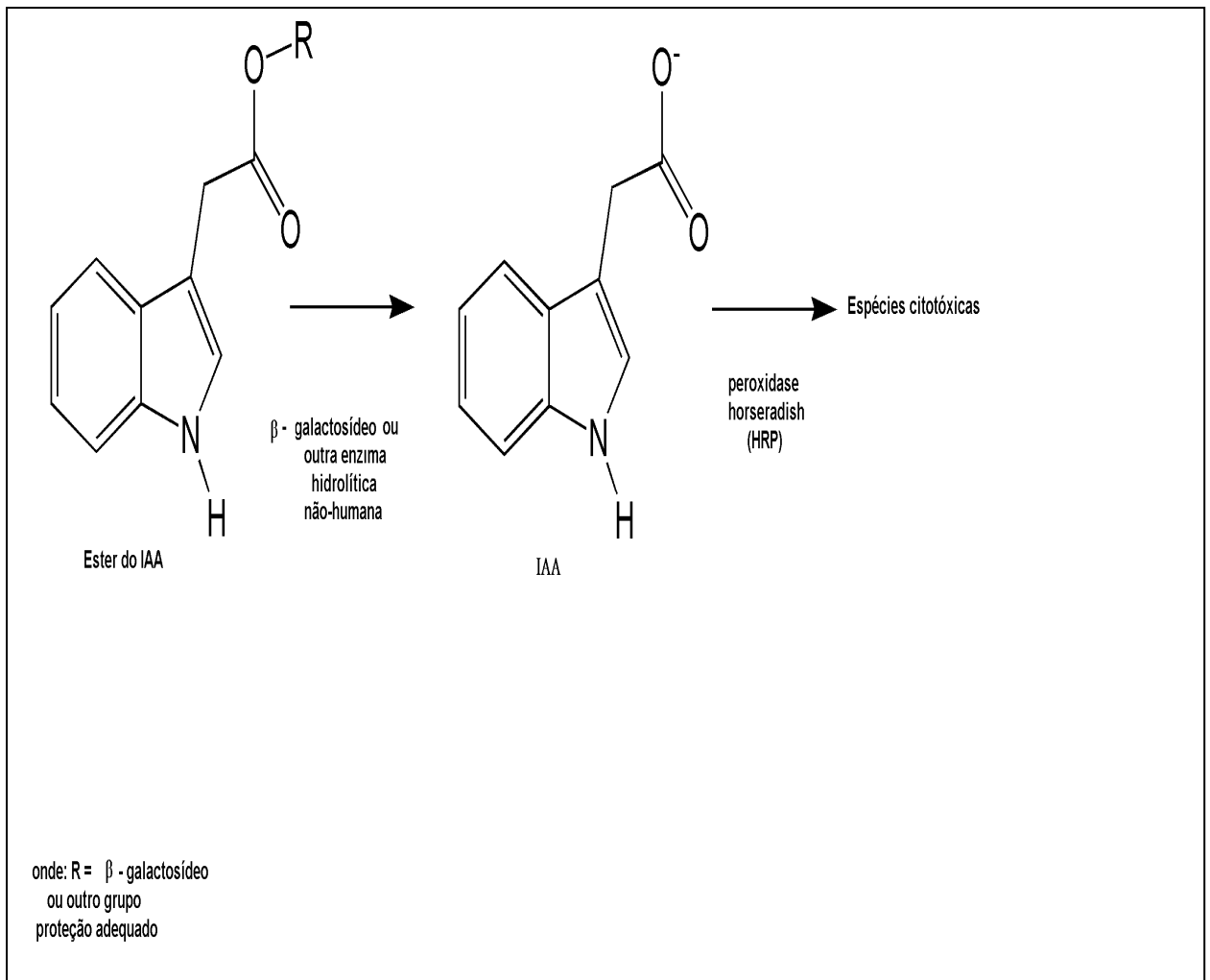


Figura 18. Proposta para o uso do Ester derivado do IAA como uma pró-droga dependente de duas enzimas para estratégia de ADEPT.

6. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Sistema IAA/HRP significativamente citotóxico para células McCoy em relação aos controles;
2. Ácido Ascórbico (10mM), Melatonina (1mM) produzem efeito eficiente;
3. A anóxia (N₂) e a oxigenação (O₂) do meio, respectivamente, protegem e aumentam o efeito citotóxico do sistema IAA/HRP;
4. A catalase é ineficiente na proteção das células McCoy para o mesmo sistema;
5. Pelos dados obtidos, o mecanismo de citotoxicidade é dependente de radicais livres, que sabidamente são indutores de necrose em modelos celulares;
6. A tríade Etil ester IAA/ esterase/ HRP mostrou ser um novo e eficiente sistema enzimático, produtor de citotoxicidade seletiva, podendo ser utilizado como modelo para novas estratégias ADEPT e correlatas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, N.; SHIMMA, N.; TAKASHIRO, Y.; HATORI, Y.; HIRABAYASHI, T.; HORIE, S.; SAITO, T.; MURAYAMA, T. Decrease in cytosolic phospholipase 2 α mRNA levels by reactive oxygen species via MAP Kinase pathways in PC12 cells: effects of dopaminergic neurotoxins. **Cell Signal.**, v.17, p. 597-604,2005.

ALAOUI, A.E.; SAHA, N.; SCHMIDT, F.; MONNERET, C.; FLORENT, J.C.; New Taxol (paclitaxel) prodrugs designed for ADEPT and PMT strategies in cancer chemotherapy. **Bioorg Med Chem.**, v.14,p. 5012-5019, 2006.

BAGSHAWE, K.D. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. **Expert Rev Anticancer.**, Ther vol.6, p.1421-1431, 2006.

BAGSHAWE, K.D.; SHARMA, S.K.; SPRINGER, C.J.; ROGERS, G.T.; Antidoby directed enzyme produg therapy (ADEPT). A review of some theoretical, experimental and clinical aspects. **Ann. Oncol.**, v. 5, p. 879-891,1994.

BALLONE, G.J., - *Melatonina* - in. **PsiquWeb Psiquiatria Geral**, Internet, disponível em <<http://gballone.sites.uol.com.br/geriat/melatonina.html>, acesso 2 de fevereiro de 2007.

BANDURSKI, R.S.; COHEN, J.D.; SLOVIN, J.P.; REINECKE, D.M.; Auxin biosynthesis and metabolism. IN: DAVIES, P.J., editor. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: kluwer Academic Plublishers, p. 3965, 1995.

BARILE, F.A. Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods. **Boca Raton: CRC Press, Inc.**, p. 222, 1994.

BORENFREUND,E.;PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett.**, v. 24, p.119–124,1985.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; WARDMAN, P. Amplification of oxidative stress by decarboxylation: a new strategy in anti-tumor drug synthesis. **Biochem. Soc. Trans.**, v.23, p.262s, 1995.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; DENIS, M.F.; PATEL, K.B.; EVERETT, S.A.; STRATFORD, M.R.L.; WARDMAN, P. Free-radical intermediates and stable products in the oxidation of indole-3-acetic-acid. **J Phys Chem.**, v.98, p. 10131-10137, 1994.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; WARMAN, P. Enhancement of peroxidase-induced lipid peroxidation by indole-3-acetic acids: effect of antioxidants. **Redox. Resp.**, v.2, p.141-147, 1996.

CARVALHO, P.R.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Antioxidant quinonemethide Triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity.**, v. 2, p. 367-372, 2005.

CHENG, H.; CAO, X.; XIAN, M.; FANG, L.; CAI, T.B.; JI, J.J.; TUNAC, J.B.; SUN, D.; WANG, P.G. Synthesis and enzyme-specific activation of carbohydrate-geldanamycin conjugates with potent anticancer activity. **J Med Chem.**, vol.48, p.645-652, 2005.

DAS, M.; MUKHERJEE, S.B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induced apoptosis like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Cell Sei.**, v.114, p.1461-2469, 2001.

DIENGOTT, D.; MIRSKY I.A. Hypoglycemic action of indole-3-acetic acid by mouth in patients with diabetes mellitus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 93, p.109-110, 1956.

DUNFORD, H.B. Heme peroxidases. **Wiley-VCH.**, New York, 1999.

ENGVILD, K.C., The death hormone hypothesis. **Physiol Plant.**, v.77, p.282-285, 1989.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S., Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira.**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FOLKES, L.K.; CANDEIAS, L.P.; WARDMAN, P. Toward targeted "oxidation therapy" of cancer: peroxidase-catalysed cytotoxicity of indole-3-acetic acids. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v.142, p.917-920, 1998.

FOLKES,L.K.;DENNIS,M.F.;STRATFORD,M.R.L.;CANDEIAS,L.P.;WARDMAN,P., Peroxidase- catalysed effects of indole-3-acetic acid and analogues on lipid membranes, DNA and mammalian cells in vitro. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, p. 375-382, 1999.

FOLKES, L.K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species a potential new role for plant auxins in cancer therapy. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, p.129-136, 2001.

FOLKES, L.K.; ROSSITER, S.; WARDMAN, P. Reactivity toward thiols and cytotoxicity of 3-methylene-2-oxindoles, cytotoxins from indole-3-acetic acids, on activation by peroxidases. **Chem Res Toxicol.**, vol.15, p.877-882, 2002.

GAZARIAN, I.G.; LAGRIMINI, L.M.; MELLON, F.A.; NALDRETT, M.J.; ASHBY, G.A.; THORNELEY, R.N. Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl acetic acid. **Biochem J.**, vol.333, p.223-232, 1998.

GORICOCHEA, B; ZAGO, M.A. Bases moleculares e Citogenéticas. Oncogenes e antioncogenes. **In: Hematologia. Fundamentos e Prática**, ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Ed Atheneu, p.375, 2004.

GRECO, O.; FOLKES, L.K.; WARDMAN, P.; TOZER, G.M.; DACHS, G.U. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid. **Cancer Gene Ther.**, vol.7, p.1414-1420, 2000.

GRECO, O.; DACH, G.U., Gene-directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. **J. Cell Physiol.**, vol.187,p. 22-36, 2001.

GRECO, O.; ROSSITER, S.; KANTHOU, C.; FOLKES, L.K.; WARDMAN, P.; TOZER, G.M.; DACHS, G.U., Horseradish peroxidase mediated gene therapy: choice of prodrugs in oxic and anoxic tumor conditions. **Mol. Can. Ther.**, vol.1, p.151-160, 2001.

GRECO, O.; DACHS, G.U.; TOZER, G.M.; KANTHOU, C. Mechanisms of cytotoxicity induced by horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid gene therapy. **J Cell Biochem.**, vol.87, p.221-322, 2002.

HARTEMINK, A.E. Biomass and nutrient accumulation of *Piper aduncum* and *Imperata cylindrica* fallows in the humid lowlands of Papua New Guinea. **Forest Ecology and Management.**, vol.144, p.19-32, 2004.

HATHERILL, J.R.; TILL, G.O.; WARD, P.A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents – Actions.**, vol.32, p.351-358, 1991.

HERMMINKI, A.; ALVAREZ, R.D. Human gene marker/therapy clinical protocols. **Hum. Gene Ther.**, vol.11, p.2543-2619, 2000.

HUANG, C.; LIU, L.Y.; SONG, T.S.; NI, L.; YANG, L.; HU, X.Y.; HU, J.S.; SONG, L.P.; LUO, Y.; SI, L.S. Apoptosis of pancreatic cancer bxp-3 cells induced by indole-3-acetic acids in combination with horseradish peroxidase. **World J Gastroenterol.**, vol.11. p.4519-4523, 2005.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Reviews.**, vol. 2, p.227-288, 2002.

IMEN - INSTITUTO DE METABOLISMO E NUTRIÇÃO – - in. **PsiquWeb Ácido Ascórbico Geral**, Internet, disponível em <<http://www.nutricaoclinica.com.br>>, acesso em 2 de fevereiro de 2007.

JUNG, M. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) and related approaches for anticancer therapy. **Mini Rev Med Chem.**, vol.1, p.399-407, 2001.

KAWANO, T.; KAWANO, N.; HOSOYA, H.; LAPEYRIE, F. Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, vol. 288, p.546-551, 2001.

KAWANO, T. Possible use of indole-3-acetic acid and its antagonist tryptophan betaine in controlled killing of horseradish peroxidase-labeled human cells. **Medical Hypotheses.**, vol. 60, p.664-666, 2003.

KIM, D.S.; JEON, S.E.; PARK, K.C. Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells. **Cell Signal.**, vol. 16, p. 81-88, 2004.

KIM, D.S.; JEON, S.E.; JEONG, Y.M.; KIM, S.Y.; KWON, S.B.; PARK, K.C. Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase-induced apoptosis. **FEBS Lett.**, vol.580,p.1439-1446, 2006.

KIM, D.S.; KIM, S.Y.; JEONG, Y.M.; JEON, S.E.; KIM, M.K.; KWON, S.B.; PARK, K.C. , Indole-3-Acetic Acid/Horseradish Peroxidase- Induced Apoptosis Involves Cell Surface CD95 (Fas/APO-1) Expression. **Biolm Pharm. Bull.**, vol.29, p. 1625-1629, 2006.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol.**, vol.77, p.598-625, 2005.

KRATZ, F.; MÜLLER, I.A.; RYPPA, C.; WARNECKE, A. Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy. **ChemMedChem.**, vol.3 ,p.20-53, 2007.

MELO, M.P.; LIMA, T.M.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R.; The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicology Letters.**, vol. 148, p.103-111, 2004.

NAKAJIMA, R.; YAMAZAKI, I. The mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by horseradish peroxidases. **J Biol Chem.**, vol.254, p.872-878, 1979.

O`BRIEN, P.J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions.**, vol.129, p.113-139, 2000.

PEDONE, E.; SEARLE, F.; BROCCINI, S.J. Diethylstilbestrol glutamate as a potential substrate for ADEPT. **J Drug Target.**, vol.14, p.437-43, 2006.

RYAN, O.; SMYTH, M.R.; FÁGÁIN, C.O. Horseradish peroxidase: the analyst's friend. **Essays Biochem.**, vol.28, p.129-146, 1994.

SCHMITT, C.A. Senescence, apoptosis and therapy-cutting the lifelines of cancer. **Nature Reviews.**, vol. 3, p.286-295, 2003.

SILVA, A.T.; CHUNG, M.C.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.; FERREIRA, E.I. Advances in prodrug design. **Mini Rev Med Chem.**, vol.5, p.893-914, 2005.

TAFAZOLI, S.; O' BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cytotoxic effects of indole-3-acetic derivate radicals. **Chem. Res. Toxicol.**, vol.17,p.1350-1355, 2004.

THOMAS, M.; RIVault, F.; TRANOY-OPALINSKI, I.; ROCHE, J.; GESSON, J.P.; PAPOT, S. Synthesis and biological evaluation of the suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) beta-glucuronide and beta-galactoside for application in selective prodrug chemotherapy. **Bioorg Med Chem Lett.**, vol.17, p.983-986, 2007.

TUPPER, J.; GRECO, O.; TOZER, G.M.; DACHS, G.U.; Analysis of the horseradish peroxidase/ indole-3-acetic acid combination in a three-dimensional tumor model. **Cancer Gene Ther.**, vol.11, p.508-513, 2004.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry.**, vol.65, p.249-259, 2004.

XU, G.; McLEOD, H.L. Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. **Clin Cancer Res.**, vol.7, p.3314-3324, 2001.

XU, K.L.; ZHANG, Y.; PAN, X.Y.; LU, Q.X. Inhibiting the expression of CD28 costimulatory molecule on human lymphocytes by special siRNA. **Chinese Med J (Engl).**, vol.118, p.480-6, 2005.

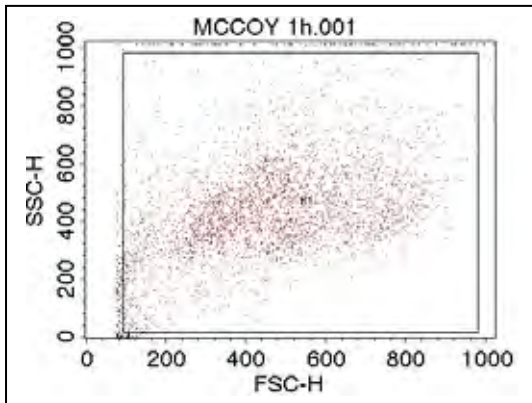
XIMENES, V.F.; CAMPA, A.; CATALANI L.H. The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent. **Arch Biochem Biophys.**, vol.387, p.173-179, 2001.

WANG, S.; LIU, D.; ZHANG, X.; LI, S.; SUN, Y.; LI, J.; ZHOU, Y.; ZHANG, L. Study on glycosylated prodrugs of toxoflavins for antibody-directed enzyme tumor therapy. **Carbohydr Res.**, vol.342, p.1254-1260, 2007.

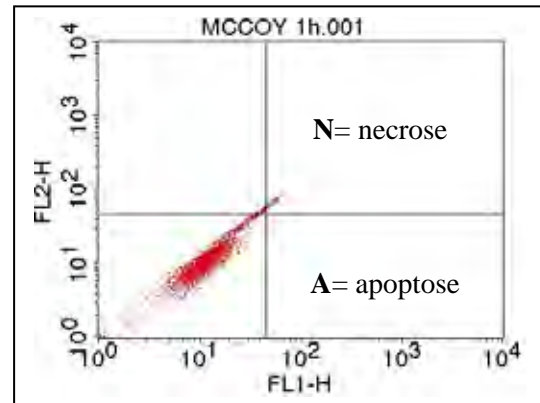
8. ANEXOS

8.1. Avaliação da citotoxicidade para as células McCoy do sistema IAA/HRP por citometria de fluxo.

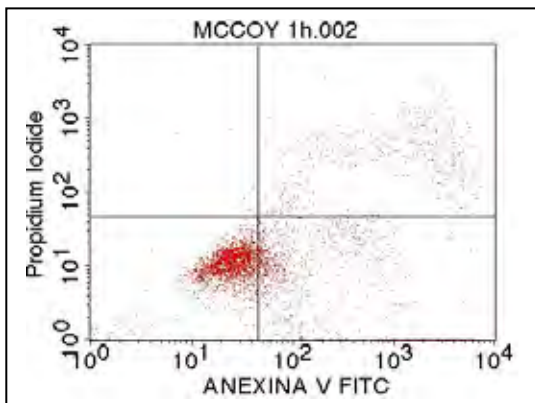
8.1.1. Análise da citotoxicidade realizada por citometria de fluxo. Células McCoy ($4,5 \times 10^4/\text{mL}$) IAA (1mM e 2mM) e HRP ($1\mu\text{M}$ final) em meio PBS com incubação de 1 hora



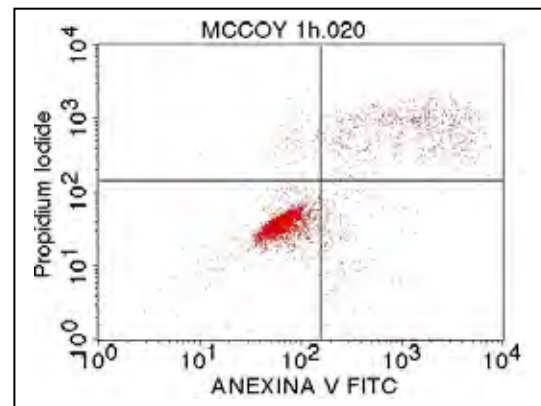
Contagem de células inicial



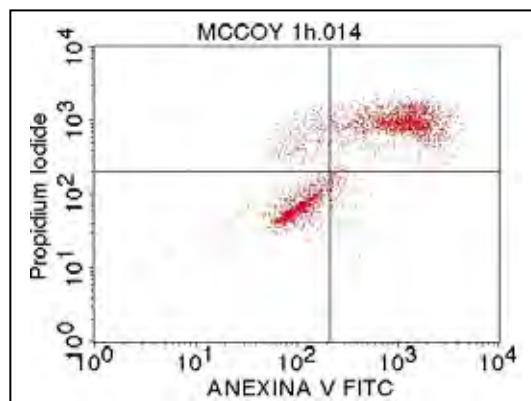
"gate" controle de células vivas



CT PBS/1h

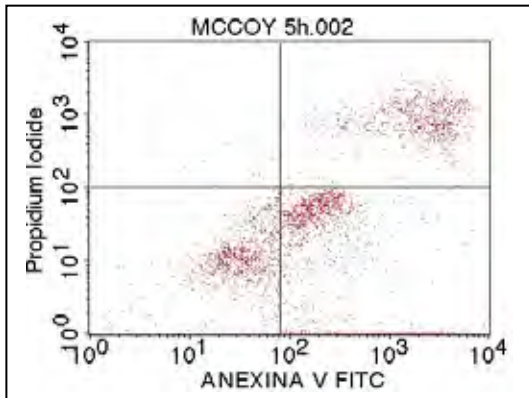


Teste PBS IAA(1mM) /HRP(1μM)/1h

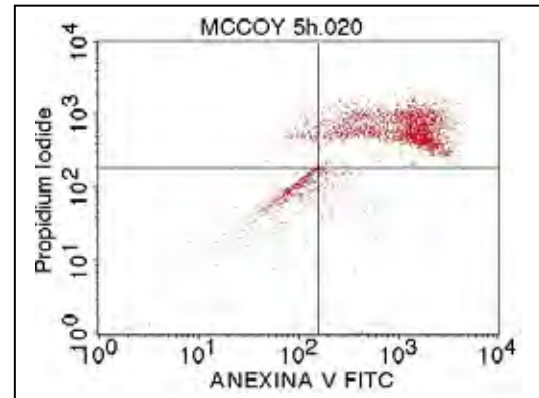


Teste PBS IAA(2mM)/HRP(1μM)/1h

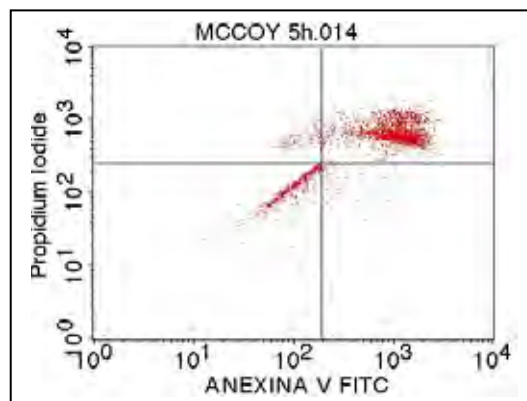
8.1.2. Análise da citotoxicidade realizada por citometria de fluxo. Células McCoy (4,5 x10⁴/mL) IAA (1mM e 2mM) e HRP (1µM final) em meio PBS com incubação de 5 horas.



CT PBS 5h

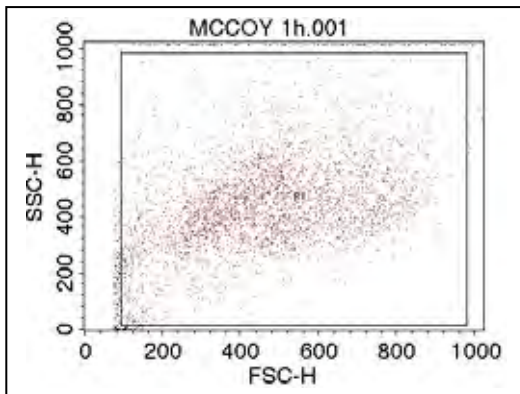


Teste PBS IAA(1mM) /HRP(1µM)/5h

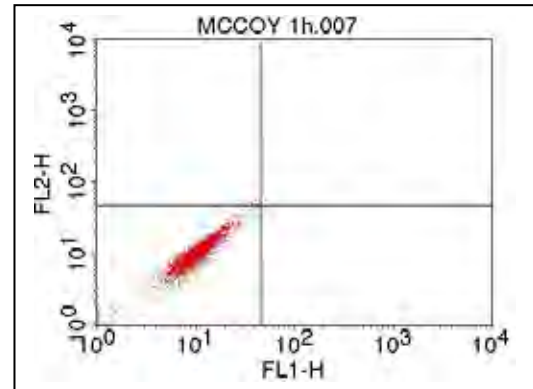


Teste PBS IAA(2mM)/ HRP(1µM)/5h

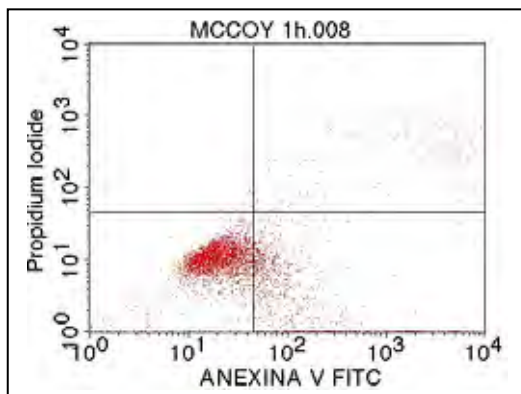
8.1.3. Análise da citotoxicidade realizada por citometria de fluxo. Células McCoy ($4,5 \times 10^4/\text{mL}$) IAA (1mM e 2mM) e HRP ($1\mu\text{M}$ final) em meio Eagle com incubação de 1 hora.



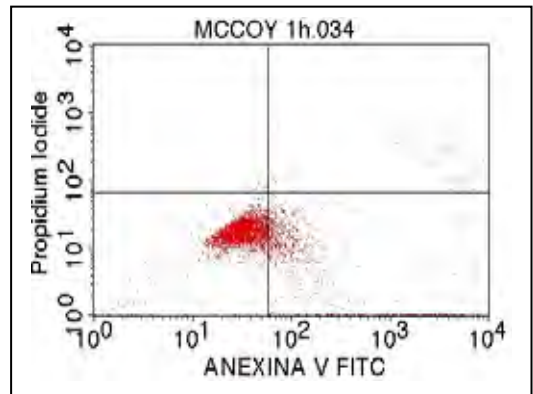
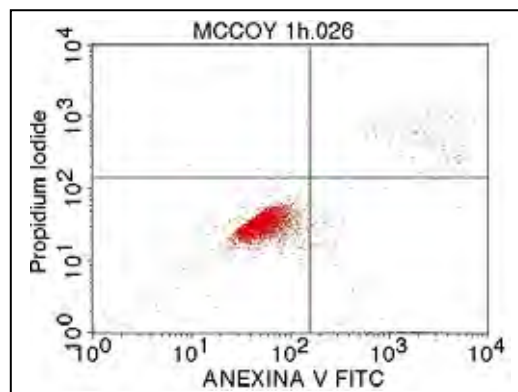
Contagem de células inicial



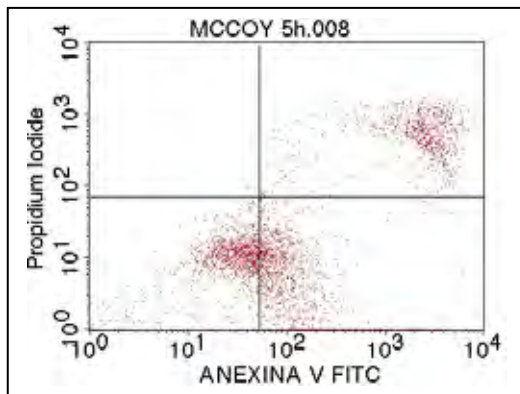
"gate" Controle de células vivas



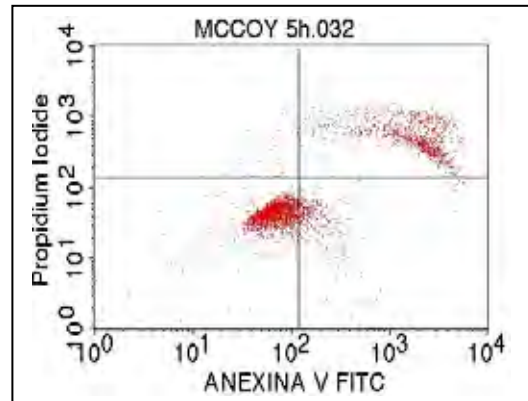
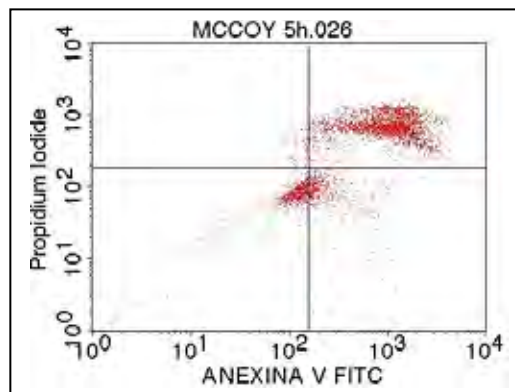
CT Eagle 1h

Teste Eagle IAA(1mM)/HRP($1\mu\text{M}$)/1hTeste Eagle IAA(2mM)/HRP($1\mu\text{M}$)/1h

8.1.4. Análise da citotoxicidade realizada por citometria de fluxo. Células McCoy ($4,5 \times 10^4$) IAA (1mM e 2mM) e HRP ($1\mu\text{M}$ final) em meio Eagle com incubação de 5 horas.



CT Eagle 5h

Teste Eagle IAA(1mM)/HRP ($1\mu\text{M}$)/5hTeste Eagle IAA(2mM)/HRP($1\mu\text{M}$)/5h

8.2. ANEXO

Artigo submetido à revista **Biological Chemistry (Biomed)**

The triad indole-3-acetic acid ethyl ester/esterase/horseradish peroxidase as a new cytotoxic prodrug/enzyme combination

^a Débora Helena Pereira, ^a Rodrigo Rezende Kitawaga, ^a Maria Stella Gonçalves Raddi, ^a Rosângela Gonçalves Peccinini, ^a * Luiz Marcos da Fonseca and ^b * Valdecir Farias Ximenes

^a Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP, Brasil.

^b Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, SP, Brasil.

* Authors for correspondence:

E-mail: vfximenes@fc.unesp.br or fonseclm@fcfar.unesp.br

Departamento de Química, Faculdade de Ciências de Bauru
Universidade Estadual Paulista, CEP 17033-360, Bauru, São Paulo,
Brasil

Phone: (+ 55) 14 3103 6088

Fax: (+ 55) 14 3103 6099

Abstract

Background: The antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) is a means of restricting the action of toxic drugs to tumor site. The pair enzyme/prodrug horseradish peroxidase (HRP)/indole-3-acetic acid (IAA) has been applied in the ADEPT strategies. In this combination, the non-toxic plant hormone IAA is activated to cytotoxic species by the catalytic action of HRP. Here we studied the use of the IAA ester derivative, IAA-ethyl ester, as a new cytotoxic prodrug/enzyme combination. **Results:** We found that HRP was not able to catalyze the oxidation of IAA-ethyl ester in the absence of an additional esterase. Hence, we controlled the cytotoxicity of IAA, by using two enzymes, HRP and esterase. We present evidence for the potential application of a triad IAA-ethyl ester/esterase/horseradish peroxidase as a new potential strategy for the ADEPT or related strategies. **Conclusions:** We suggest that this technique could provide more selectivity for the generation of cytotoxic drugs in tumor sites.

Key words: ADEPT; Indole-3-acetic acid; Indole-3-acetic acid ethyl ester; horseradish peroxidase, esterase

Background

Anticancer drugs are characterized by a narrow therapeutic window that results mainly from a high systemic toxicity of the drugs in combination with an evident lack of tumor selectivity [1]. Hence, the strategy known as Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) is a means of restricting the action of toxic drugs to tumor site. In ADEPT, an enzyme is linked to the antibody that targets the tumor cells. After administration of this conjugate and clearance of the non-bonding circulating antibody, a nontoxic prodrug, a substrate for the enzyme, is then given and, by cleaving an inactivating component from the prodrug, a potent cytotoxic agent is generated [2,3]. The ideal drugs for ADEPT are small molecules that can diffuse within the tumor tissues and cause the cytotoxic effect. Additionally, the enzyme system should not have a human homologue to avoid prodrug activation outside the tumor site [4]. Some recent developments in this area include (enzyme/prodrug): β -glucosidase/glycoside of toxoflavin [5]; β -galactosidase/ β -galactoside of suberoylanilide hydroxamic acid [6]; carboxypeptidase/diethylstilbestrol-glutamate [7]; β -D-glucuronidase/ glucuronide paclitaxel [8]; β -galactosidase /carbohydrate-geldanamycin conjugates [9].

In 1998, Folkes et al. proposed the pair horseradish peroxidase (HRP)/ indole-3-acetic acid (IAA) as an enzyme/prodrug combination with potential application in the ADEPT technology [10]. This combination meets the criteria for the ADEPT strategy since HRP is a plant enzyme and IAA, a plant hormone, is nontoxic for humans. In fact, there are many mammalian endogenous peroxidases; however, HRP is the only one able to catalyze the oxidation of IAA in the absence of hydrogen peroxide, which is crucial for its potential use in the ADEPT. Under the enzymatic action of HRP, IAA is oxidized producing cytotoxic radical and non-radical species. Following this seminal work, many

papers have presented and discussed the mechanism of cytotoxicity of HRP/IAA in several tumor cell lines. For instance, the identification of 3-methylene-2-oxindole as a cytotoxic species generated during the oxidation of IAA, which is reactive towards endogenous nucleophiles as glutathione, cysteine, and a cysteinyl peptide [11]. The use of antioxidants, to block the apoptosis of human melanoma cells induced by IAA/HRP, is an evidence that free radicals play an important role in the mechanism of cytotoxicity [12]. The finding that catalase prevents IAA/HRP-induced apoptosis of G361 human melanoma cells is an indication that hydrogen peroxide may be also involved in the mechanism of action [13].

Considering the high specificity of HRP towards IAA, we hypothesized that its ethyl ester, indole-3-acetic acid ethyl ester (IAA-ethyl ester), would not be recognized by the enzyme, consequently, we could link the generation of cytotoxic species to two enzymes. Hence, we present evidence of this potential application of a triad indole-3-acetic acid ethyl ester/esterase/horseradish peroxidase as a new strategy for ADEPT or related strategies.

Methods

Chemicals and Cell Culture

Indole-3-acetic acid, indole-3-acetic acid ethyl ester, melatonin, ascorbic acid, neutral red, esterase from porcine liver (ammonium sulfate suspension, 160unit/ml) and HRP (Type VI) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Trypan blue was purchased from Vetec (RJ, Brazil). McCoy mouse fibroblast cells (ATCC CRL 1696) were obtained from the Cell Culture Section of the Instituto Adolfo Lutz (SP, Brazil). They were transformed into a continuous cell line and used to assess the in vitro basal toxicity. The 5% trypan blue solution was prepared in 0.9% NaCl. The neutral red stock solution was 4 mg/ml in PBS and the work solution of neutral red was prepared by diluting the stock solution to 50 µg/ml in Eagle medium.

Trypan Blue assay

McCoy cells were assessed for viability by trypan blue exclusion assay where living cells with intact cell membranes do not take up the dye, while nonviable cells are unable to exclude the dye and stain dark blue. The cells (1×10^6 /ml) were incubated in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS-D) in various combinations of the tested compounds and enzymes for 1 hour, at 37°C. Then, these mixtures were (1:1) incubated with solution of trypan blue for five minutes. Cells were observed under a microscope and stained and unstained cells were counted in a hemocytometer and the percentage of death cells calculated [14].

Neutral red assay

The McCoy cells were maintained in the Eagle medium with 7.5% fetal bovine serum. After trypsinization, 0.2 ml aliquots of medium containing approximately 10^4 cells/ml were seeded into 96-well tissue-culture plates and incubated at 37 °C. After 24 h, the Eagle medium was removed and the cells were placed into unmodified medium (control) or in a modified medium with various concentrations of tested compounds and enzymes. After incubating for another 24 hr, the medium was removed and the plates were prepared for microculture neutral red assay [15]. After a brief agitation, the plates were transferred to a microplate reader (Spectra and Rainbow (Shell) Readers – Tecan, Austria) and the optical density of each well was measured using a 540 nm filter and 620 nm reference wavelength. All experiments were performed at least four times.

Oxygen uptake study

The mixture of reaction contained 1 mM IAA, 1 mM IAA-ethyl ester, 0.5 μ M HRP, and various concentration of esterase in 0.05 M phosphate buffer pH 5.5. The reactions were monitored with a Clark-type Electrode (Yellow Spring Instruments 5300A) coupled to a X-Y recorder (EG & G, Princeton Applied Research). The reactions were performed at 37°C in a final volume of 3 ml and triggered by adding the enzymes.

High performance liquid chromatographic (HPLC) study

The reaction mixtures consisted of 1 mM IAA or 1 mM IAA-ethyl ester, 0.5 μ M HRP and/or 3.0 units/ml esterase in 0.05 M phosphate buffer pH 5.5 were incubated at 37°C, for 30 min. Then, an aliquot of 20 μ L was injected into the HPLC system (Waters 2690 Separation Module in line with a Waters 996 UV-Vis Detector set at 254 nm). The analyses were carried out isocratically on a Luna C18 reversed-phase column (250 x 4.6 mm, 5 μ m) and the mobile phase was 75:25 water/acetonitrile (flow rate 1.0 ml/min).

Results

The oxidations of IAA and its ethyl ester catalyzed by HRP were monitored by the consumption of dioxygen dissolved in the reaction medium. As well established, the mechanism for HRP-catalyzed oxidation of IAA, in the absence of H₂O₂, involves an oxidative decarboxylation, leading to a skatolyl radical [16,17]. Here, the oxidation studies were conducted in a slightly acid medium (pH 5.5), which is ideal for HRP-catalyzed oxidation of IAA [16,18]. The radical coupling between the skatolyl and dioxygen explains the fast oxygen uptake when IAA was mixed with HRP (Fig. 1A) [10]. The oxidations were also studied at the physiological pH. Although the relative reaction rate for oxidation was decreased, as compared to that at pH 5.5, similar results were obtained at pH 7.4 (Fig. 1B).

The HRP was completely inactive when IAA was replaced by its ethyl ester derivative. However, when an esterase was added in the reaction mixture leading to hydrolysis of IAA-ethyl ester to the precursor IAA, the oxidation took its natural course. The confirmation that esterase was catalyzing the hydrolysis of the IAA-ethyl ester to IAA was obtained by HPLC. The chromatograms depicted in Fig. 2 show the peak of IAA (trace A), the peak of IAA-ethyl ester (trace B), the peak of IAA-ethyl ester after hydrolysis (trace C) and the peaks obtained when the reaction mixture containing IAA-ethyl ester, esterase and HRP was injected (trace D).

The potential cytotoxicity of IAA and its ethyl ester in combination with HRP was assessed using the lineage of fibroblast cells, McCoy cells. Using the trypan blue exclusion assay, which is based in the rupture of the cell membrane, it was found that the combination HRP/IAA is highly cytotoxic in this experimental model (Fig. 3). The inset in Fig. 3 also shows that neither HRP nor IAA alone, were cytotoxic.

The mechanism of cytotoxicity of IAA/HRP is linked to the generation of oxidant species including peroxy radical and hydrogen peroxide [13,19]. In agreement, Fig. 4 shows that antioxidant substances, as melatonin and ascorbic acid, were partially able to impair the cells death. When the reaction mixture was made anaerobic, by bubbling nitrogen during the reaction course, the cytotoxicity of the pair IAA/HRP was significantly decreased (Fig. 4). This is one more evidence of the generation of peroxy radicals. As expected, considering the lack of reactivity between HRP and the IAA-ethyl ester, this pair enzyme/prodrug was significantly less cytotoxic in the absence of the esterase (Fig. 5).

Similar results were obtained using the neutral red assay which is based on the uptake of neutral red in the lysosomes of living cells [15]. In this case, the cells were incubated for 24 h with the various combinations of IAA or IAA-ethyl ester and enzymes. Once again, a significant difference for the IAA-ethyl ester alone or in combination with HRP and esterase (Fig. 6), was obtained.

Discussion

The restriction of the action of toxic drugs to tumor site is the major concern in cancer chemotherapy. Hence, the ADEPT and the related strategies such as gene-directed enzyme/prodrug (GDEPT) and virus-directed enzyme prodrug (VDEPT) therapies, are among the widely studied technologies to target tumor cells [20]. IAA is a promising candidate in this area, since it is completely devoid of toxicity before its oxidation, catalyzed by HRP [10].

The specificity of HRP towards IAA, in the absence of H_2O_2 , is really impressive, since peroxidases are among the most unspecific enzymes. Indeed, HRP belongs to a class of enzymes that use hydrogen peroxide as a co-substrate to oxidize a large number of phenols, aromatic amines and indoles derivatives [21-23]. Another important peroxidase is the myeloperoxidase, which comprises up to 5 % of the protein content in neutrophils and is responsible for the production of the bactericidal hypochlorous acid when these cells are activated [24]. However, only HRP is able to catalyze the oxidation of IAA without hydrogen peroxide [25]. This high specificity has been confirmed here, since the ethyl ester of IAA, despite its structural similarity to IAA, was not recognized as a substrate of HRP. A reasonable explanation for the lack of reactivity between HRP and IAA-ethyl ester is the impossibility of the oxidative decarboxylation. This step is responsible for the production of skatolyl hydroperoxide which is essential in the enzyme turnover and generation of cytotoxic species [16,26]. The necessity of oxidative decarboxylation during IAA-mediated generation of cytotoxic species was the basis for our application of IAA-ethyl ester as a potential prodrug. We suggest that, the experimental design, in which two enzymes are necessary to trigger the generation of cytotoxic species, could confer an improved selectivity on a tumor site.

Certainly, one could argue that esterases are ubiquitous in mammalian, and consequently, not adequate for the ADEPT strategy. However, this is just a model, and it could be advanced by the synthesis of β -galactoside or β -glycosides esters of IAA. In these cases, the cytotoxicity would be triggered by two non-mammalian enzymes, that is, HRP and β -galactosidase or HRP and β -glucosidase, which have been used in the ADEPT strategy [5,6]. Figure 7 shows our proposal for the use of ester derivatives of IAA as two-enzyme dependent prodrugs for the ADEPT strategy.

Another potential application of the IAA-ethyl ester relies on its higher liposolubility, as compared to IAA. For instance, in the GDEPT strategy, where engineered cells could express HRP [19]. In this case, after the diffusion of the IAA-ethyl ester to intracellular medium, endogenous esterases could hydrolyze the substrate, releasing IAA for the expressed HRP.

Authors' contributions

DHP and RRK performed the cytotoxicity studies, LMF and VFX conceived and designed this study and wrote this manuscript. VFX performed the oxygen uptake and HPLC studies. MSGR and RGP made substantial intellectual contributions to generate this manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study has been supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Kratz F, Müller IA, Ryppa C, Warnecke A: **Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy**. ChemMedChem 2007, **3**:20-53.
2. Bagshawe KD: **Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer**. Expert Rev Anticancer Ther 2006, **6**:1421-1431.
3. Jung M: **Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) and related approaches for anticancer therapy**. Mini Rev Med Chem 2001, **1**:399-407.
4. Xu G, McLeod HL: **Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy**. Clin Cancer Res 2001, **7**:3314-3324.
5. Wang S, Liu D, Zhang X, Li S, Sun Y, Li J, Zhou Y, Zhang L: **Study on glycosylated prodrugs of toxoflavins for antibody-directed enzyme tumor therapy**. Carbohydr Res 2007, **342**:1254-1260.
6. Thomas M, Rivault F, Tranoy-Opalinski I, Roche J, Gesson JP, Papot S: **Synthesis and biological evaluation of the suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) beta-glucuronide and beta-galactoside for application in selective prodrug chemotherapy**. Bioorg Med Chem Lett 2007, **17**:983-986.

7. Pedone E, Searle F, Brocchini SJ: **Diethylstilbestrol glutamate as a potential substrate for ADEPT.** J Drug Target 2006, **14**:437-43.
8. Alaoui AE, Saha N, Schmidt F, Monneret C, Florent JC: **New Taxol (paclitaxel) prodrugs designed for ADEPT and PMT strategies in cancer chemotherapy.** Bioorg Med Chem 2006, **14**:5012-5019.
9. Cheng H, Cao X, Xian M, Fang L, Cai TB, Ji JJ, Tunac JB, Sun D, Wang PG: **Synthesis and enzyme-specific activation of carbohydrate-geldanamycin conjugates with potent anticancer activity.** J Med Chem 2005, **48**:645-652.
10. Folkes LK, Candeias LP, Wardman P: **Toward targeted "oxidation therapy" of cancer: peroxidase-catalysed cytotoxicity of indole-3-acetic acids.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998, **142**:917-920.
11. Folkes LK, Rossiter S, Wardman P: **Reactivity toward thiols and cytotoxicity of 3-methylene-2-oxindoles, cytotoxins from indole-3-acetic acids, on activation by peroxidases.** Chem Res Toxicol 2002, **15**:877-882.
12. Kim DS, Jeon SE, Park KC: **Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells.** Cell Signal 2004, **16**:81-88.

13. Kim DS, Jeon SE, Jeong YM, Kim SY, Kwon SB, Park KC: **Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase-induced apoptosis.** FEBS Lett 2006, **580**:1439-1446.
14. Xu KL, Zhang Y, Pan XY, Lu QX: **Inhibiting the expression of CD28 costimulatory molecule on human lymphocytes by special siRNA.** Chinese Med J (Engl) 2005, **118**:480-6.
15. Borenfreund E, Puerner JA: **Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption.** Toxicol Lett 1985, **24**:119-124.
16. Gazarian IG, Lagrimini LM, Mellon FA, Naldrett MJ, Ashby GA, Thorneley RN: **Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl acetic acid.** Biochem J 1998, **333**:223-232.
17. Nakajima R, Yamazaki I: **The mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by horseradish peroxidases.** J Biol Chem 1979; **254**:872-878.
18. Candeias LP, Folkes LK, Denis MF, Patel KB, Everett SA, Stratford MRL, Wardman P: **Free-radical intermediates and stable products in the oxidation of indole-3-acetic-acid.** J Phys Chem 1994, **98**:10131-10137
19. Greco O, Dachs GU, Tozer GM, Kanthou C: **Mechanisms of cytotoxicity induced by horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid gene therapy.** J Cell Biochem 2002, **87**:221-322.

20. Silva AT, Chung MC, Castro LF, Guido RV, Ferreira EI: **Advances in prodrug design**. *Mini Rev Med Chem* 2005, **5**:893-914.
21. Veitch NC: **Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme**. *Phytochem* 2004, **65**:249-259.
22. Ryan O, Smyth MR, Fágáin CO: **Horseradish peroxidase: the analyst's friend**. *Essays Biochem* 1994, **28**:129-146.
23. Ximenes VF, Campa A, Catalani LH: **The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent**. *Arch Biochem Biophys* 2001, **387**:173-179.
24. Klebanoff SJ: **Myeloperoxidase: friend and foe**. *J Leukoc Biol* 2005, **77**:598-625.
25. Dunford HB: *Heme peroxidases*. Wiley-VCH, New York; 1999.
26. Greco O, Folkes LK, Wardman P, Tozer GM, Dachs GU: **Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid**. *Cancer Gene Ther* 2000, **7**:1414-1420.

Figure Legends

Fig. 1. *Dioxygen consumption provoked by the oxidation of IAA or IAA-ethyl ester catalyzed by HRP.* (A) When present 1 mM IAA, 1 mM IAA-ethyl ester, 0.5 μ M HRP and various concentration of esterase in 0.05 M phosphate buffer pH 5.5 at 37°C The final volume was 3 ml. IAA-ethyl ester plus HRP (**trace 1**), IAA plus HRP (**trace 2**), IAA-ethyl ester plus 0.5 units/ml esterase plus HRP (**trace 3**), IAA-ethyl ester plus 1.5 units/ml esterase plus HRP (**trace 4**), IAA-ethyl ester plus 3.0 units/ml esterase plus HRP (**trace 5**). (B) Reactions at pH 7.0. IAA ethyl ester plus HRP (**trace 1**), IAA plus HRP (**trace 2**) IAA-ethyl ester plus HRP plus 3.0 unit/ml esterase (**trace 3**).

Fig. 2. *Chromatographic profile of IAA and IAA-ethyl ester.* 1 mM IAA or 1 mM IAA-ethyl ester, 0.5 μ M HRP, 3.0 units/ml esterase in 0.05 M phosphate buffer pH 5.5 at 37°C. The reaction mixture (20 μ l) was injected after 1 h of the initiation of the reaction. Peak of IAA (**trace A**), peak of IAA-ethyl ester (**trace B**), peak of IAA-ethyl ester after hydrolysis catalyzed by esterase (**trace C**) and the peaks after oxidation of the hydrolyzed IAA-ethyl ester by HRP (**trace D**).

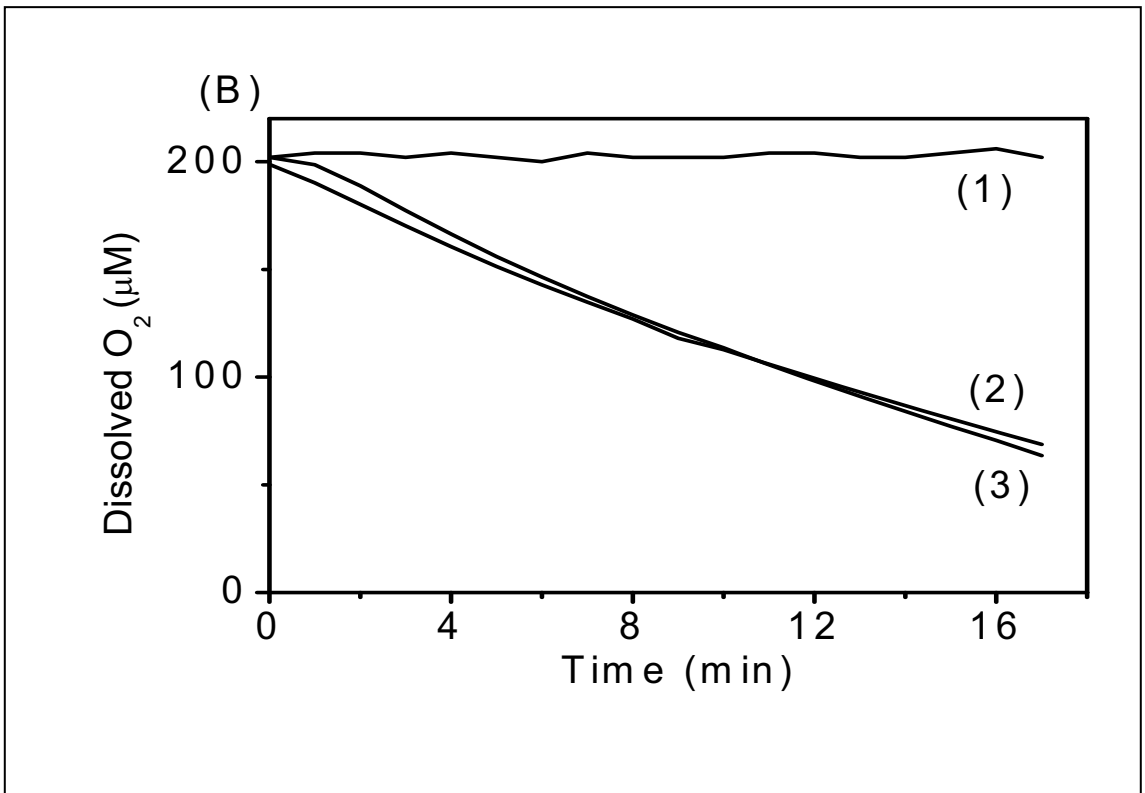
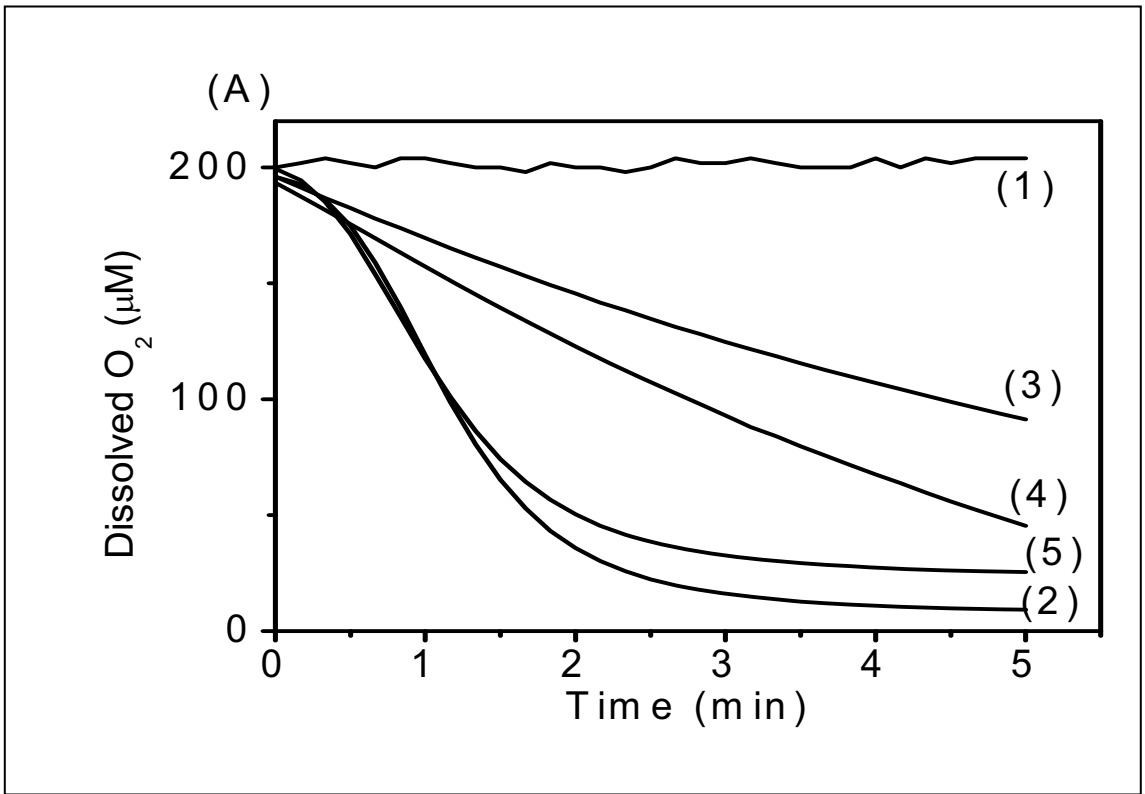
Fig. 3. *Cytotoxicity of the pair IAA/HRP on McCoy cells assessed by trypan blue exclusion assay.* McCoy cells (1×10^6 cells/ml), 1 μ M. HRP. The results are mean and SD of triplicates. (Inset) Controls with 2 mM IAA or 1 μ M HRP versus complete system.

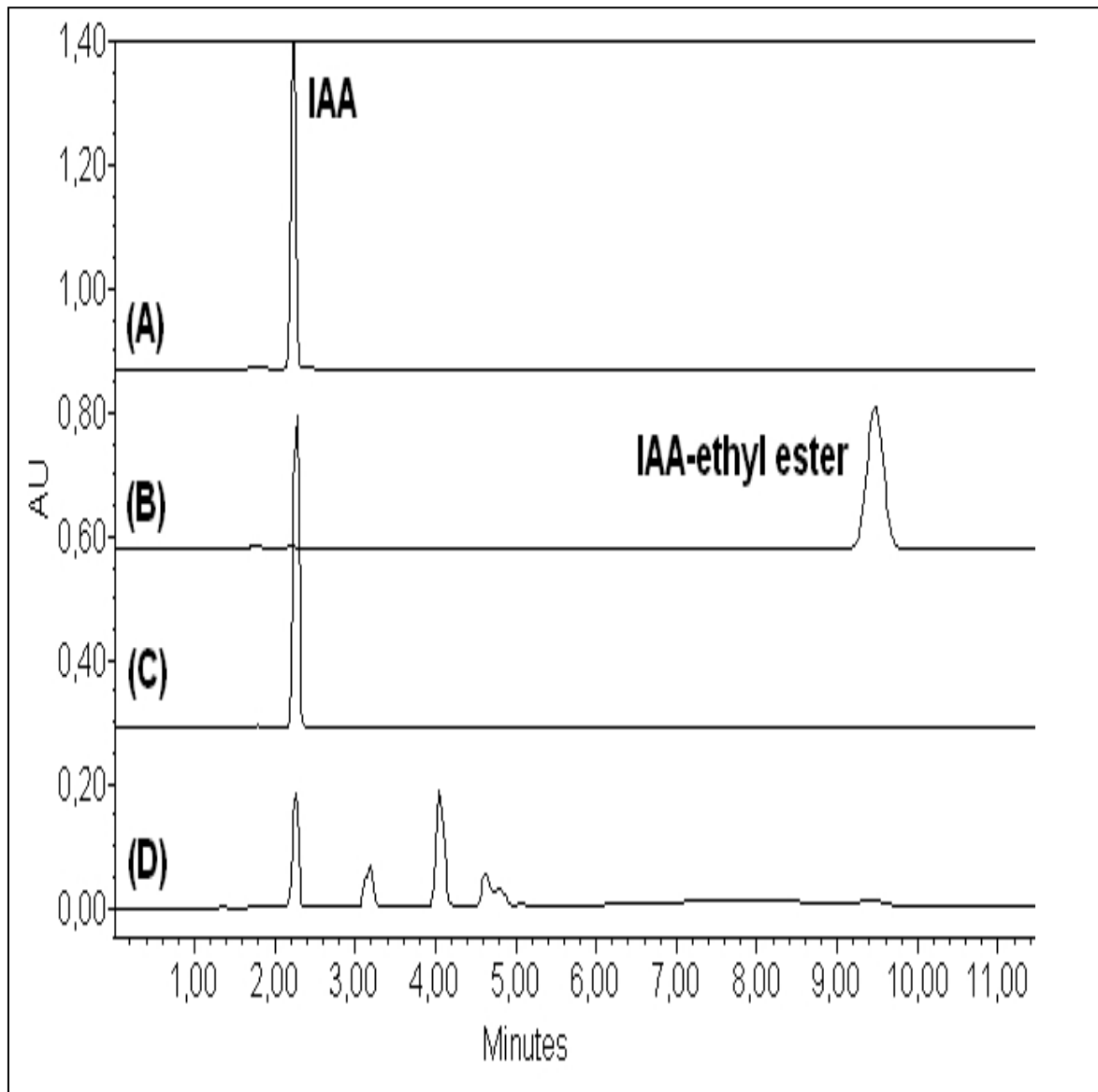
Fig. 4. *Effect of antioxidants and absence of dioxygen on HRP/IAA cytotoxicity.* McCoy cells (1×10^6 cells/ml), 2 mM IAA, 1 μ M. HRP and, when present, 1 mM melatonin or 0.1 mM ascorbic acid. In anaerobic experiments, the reaction mixtures were purged with nitrogen. The results are mean and SD of triplicates.

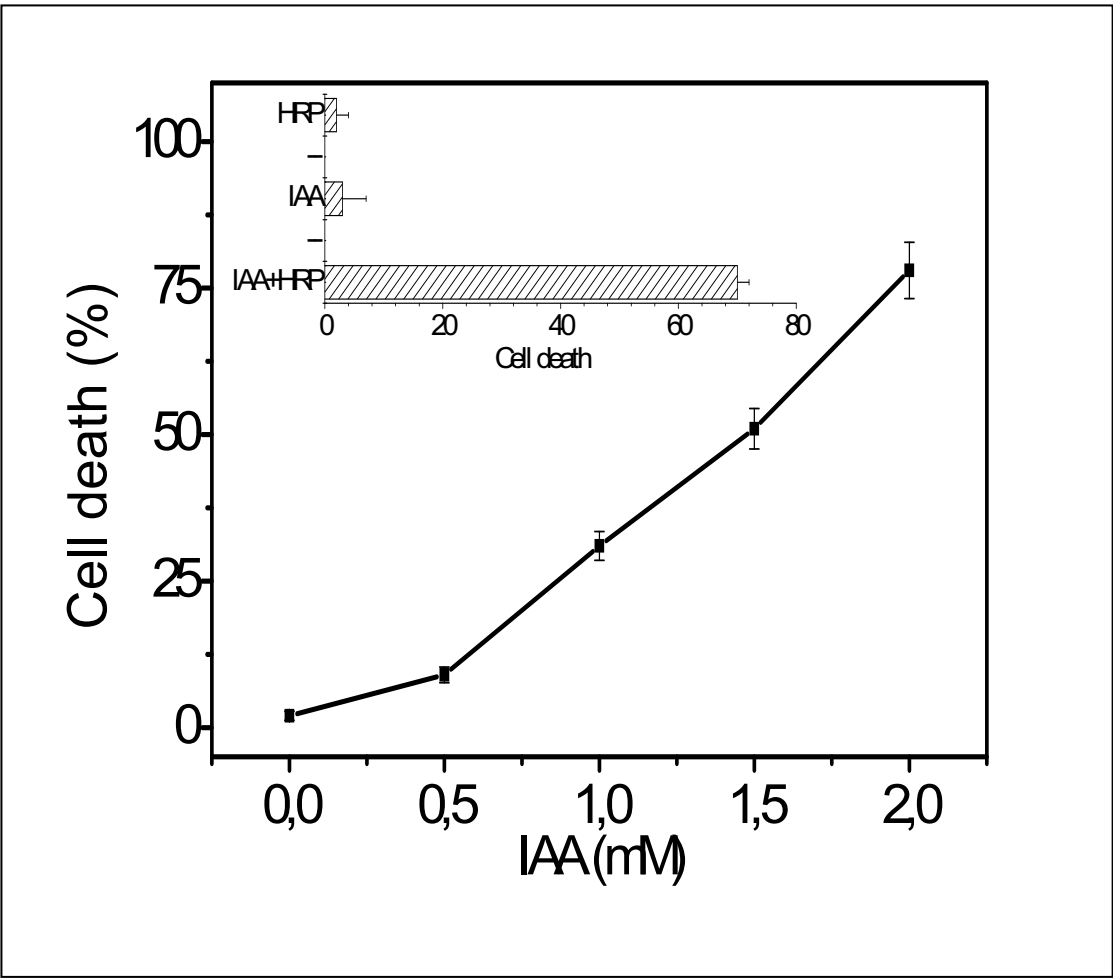
Fig. 5. *Cytotoxicity of the triad IAA-ethyl ester/esterase/HRP on McCoy cells assessed by trypan blue exclusion assay.* McCoy cells (1×10^6 cells/mL), 2 mM IAA-ethyl ester, 1 μ M HRP, 5 units/ml. The results are mean and SD of triplicates.

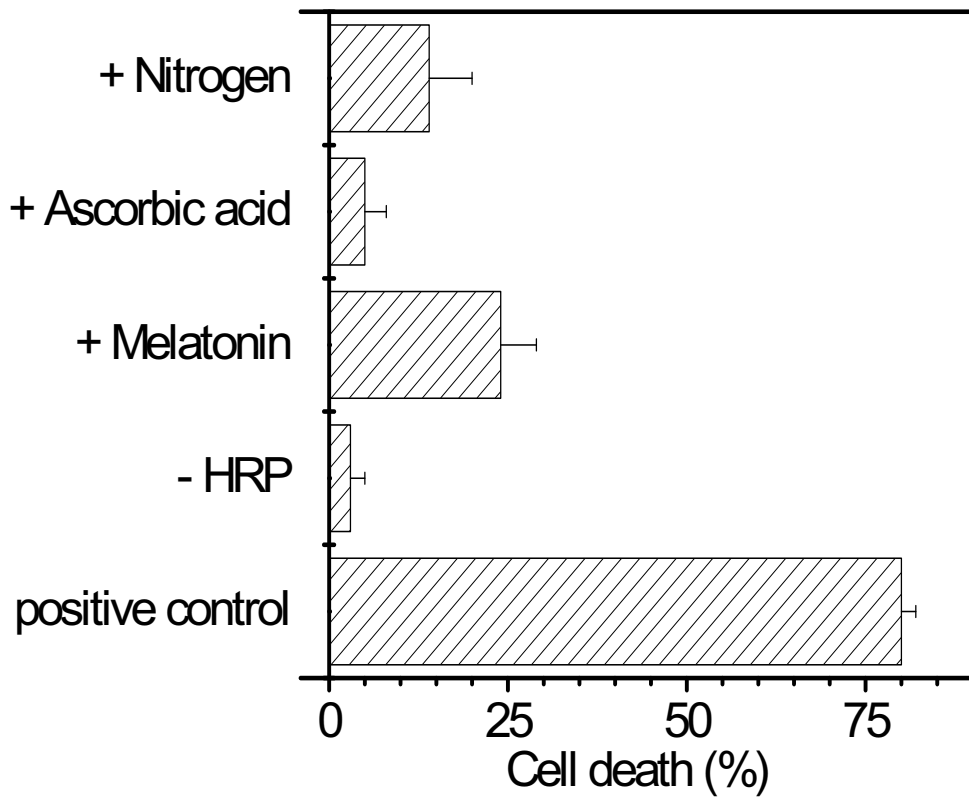
Fig. 6. *Cytotoxicity of IAA/HRP or IAA ethyl ester/esterase/HRP on McCoy cells assessed by neutral red assay.* McCoy cells (1×10^4 cells/mL), 1 μ M. HRP, when present esterase 5 units/ml. The results are mean and SD of triplicates.

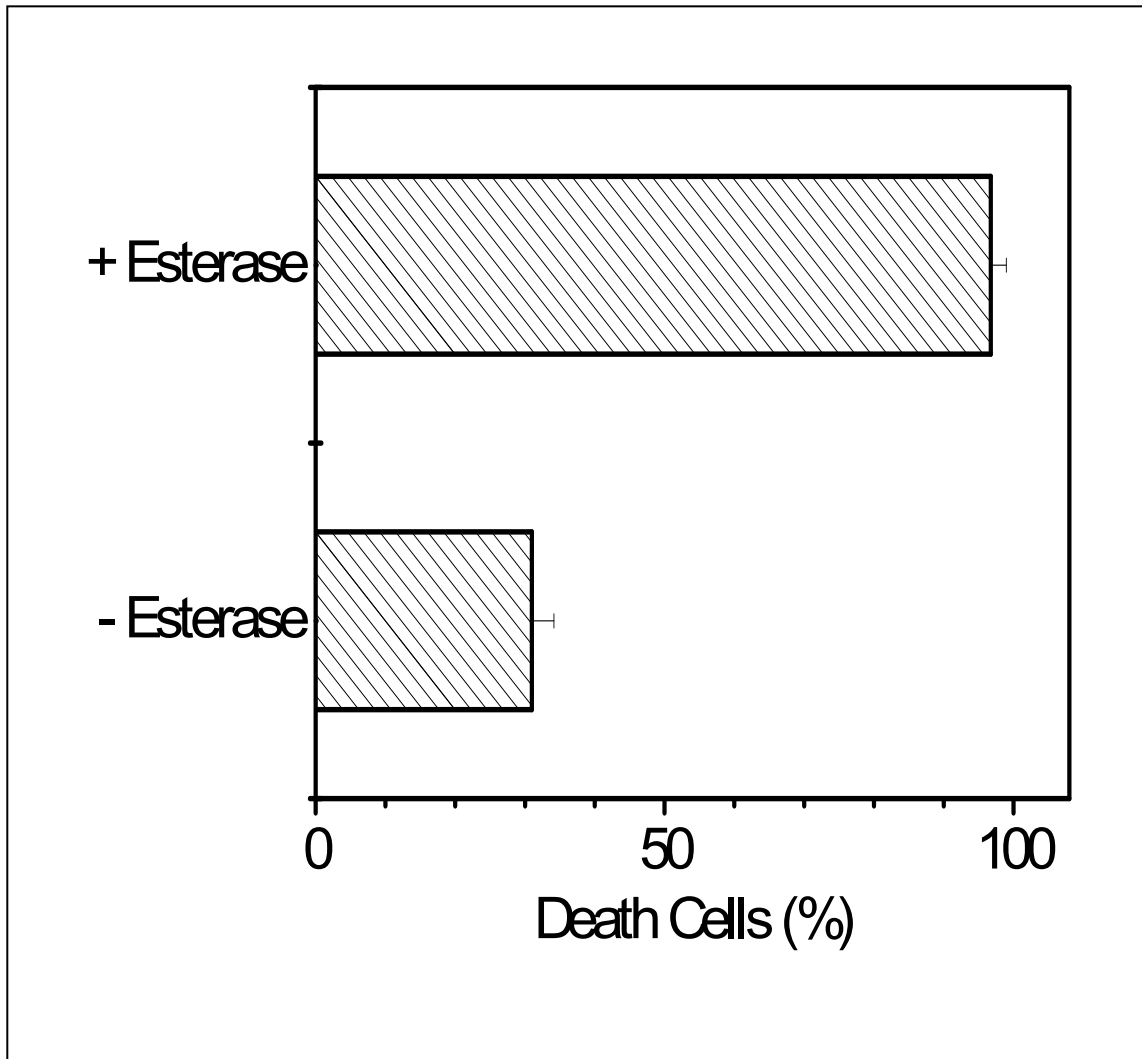
Fig. 7. Proposal for the use of ester derivatives of IAA as a two-enzyme-dependent prodrug for ADEPT strategy.

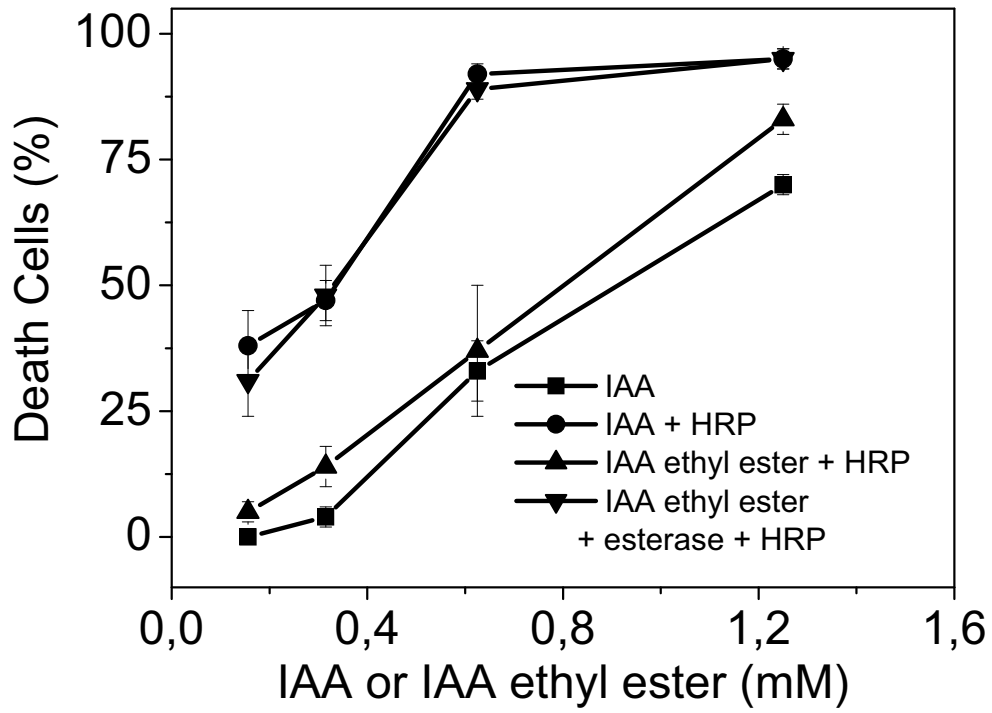


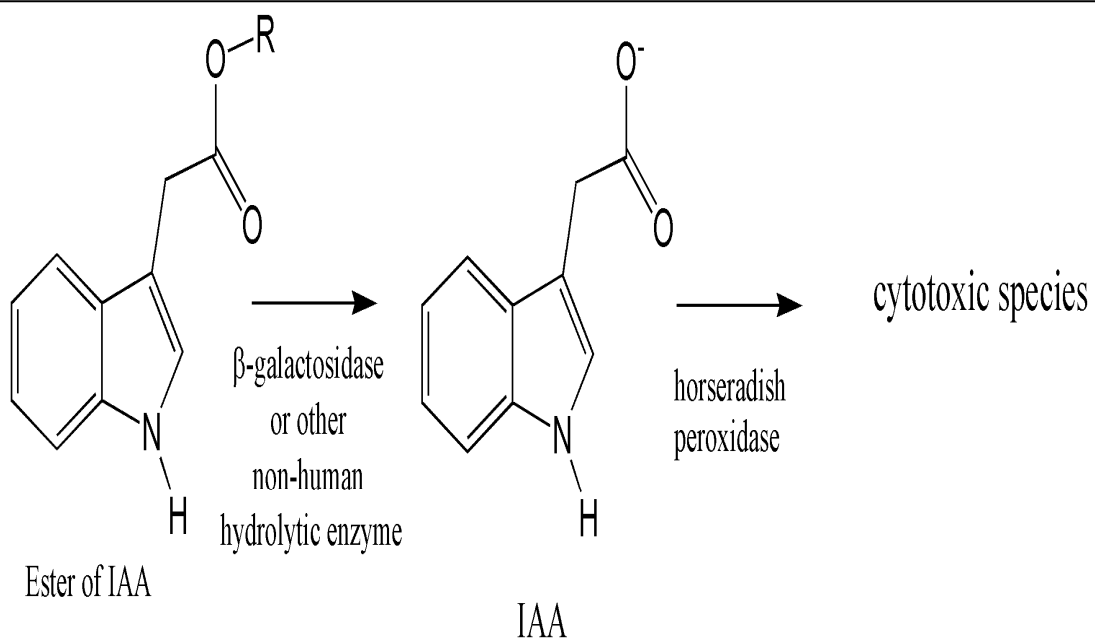












where: R = β -galactoside
or other adequate
protection group