ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO RADIOSSENSIBILIZADOR DE COMPLEXOS DE RÓDIO

Sizue O. Rogero, Ana Cecilia V. Negrón ** e Renato Najjar ***

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
C P. 11049 - CEP 05422-970, São Paulo, Brasil

** Depto. de Química Fundamental, Instituto de Química-USP <anita@iq.usp.br>

RESUMO

Radiossensibilizadores são agentes químicos que aumentam a sensibilidade das células hipóxicas à radiação, visando o aumento da eficácia da radioterapia no tratamento do câncer. Os complexos de ródio (Rh) testados neste trabalho foram os carboxilatos: Acetato [$Rh_2(ac)_4$], Trifluoroacetato [$Rh_2(Tfa)_4$] e Citrato [$Rh_2(cit)_4$]; o amidato: Trifluoroacetamidato [$Rh_2(Tfc)_4$] e seus adutos com metronidazol: $Rh_2(ac)_4metro_2$, $Rh_2(cit)_4metro_2$ e $Rh_2(Tfc)_4metro_2$. O efeito radiossensibilizador desses complexos de Rh (II) foi testado *in vitro*, irradiando-se em atmosfera hipóxica, células CHO k1 na presença dos complexos, utilizando-se raios gama provenientes de uma fonte de ^{60}Co com doses de 2,7 e 4,3 Gy. Foi realizado teste de citotoxicidade para determinar as concentrações atóxicas de cada composto, eliminando a possibilidade de morte celular devido ao efeito tóxico dos mesmos. Na dose de 2,7 Gy não houve nenhum efeito interessante, enquanto que com a dose de 4,3 Gy o $Rh_2(Ac)_4$ mostrou uma atividade radiossensibilizadora maior do que os demais complexos e semelhante aos resultados relatados na literatura com doses até 10 vezes maiores.

I. INTRODUÇÃO

Chamam-se radiossensibilizadores os agentes químicos que aumentam a sensibilidade das células hipóxicas à radiação, visando o aumento da eficácia da radioterapia no tratamento do câncer [1]. Estes podem atuar mediante mecanismos de afinidade eletrônica, ligando-se aos tióis, ou ligando-se diretamente ao DNA[2].

Nitro-heterocíclicos, especialmente nitroimidazóis, têm sido testados como radiossensibilizadores, devido à capacidade eletroatraente do grupo nitro nas posições 2 ou 5. As espécies de interesse clínico são o misonidazol (2-NO_2) e o metronidazol (5-NO_2), os quais apresentam uso limitado devido às suas toxicidades, nas doses clinicamente requeridas para a radiossensibilização [1].

Estudos de Chibber e col. [3] mostraram a ação sensibilizadora *in vitro* dos carboxilatos de Rh (II) de formula geral $Rh_2(RCOO)_4$ (R=CH_3, CH_3CH_2, $CH_3CH_2CH_2$) sobre células V79 de hamster chinês. Isto é de particular interesse devido à conhecida afinidade de tais complexos de Rh pelos constituintes celulares que contêm enxofre.

Posteriormente, sendo conhecido o efeito radiossensibilizador dos nitroimidazóis e dos carboxilatos de ródio (Rh), Goodgame e col. [1] reportaram a síntese e caracterização de adutos de acetato de Rh com uma série de nitroimidazóis, onde o aduto com misonidazol mostrou-se mais eficiente sobre células V79, em concentrações ainda menores do que o acetato de Rh(II) e misonidazol isoladamente.

As curvas de sobrevida de células de mamíferos testadas *in vitro* e reportadas na literatura são realizadas utilizando-se altas doses de radiação, de 6 a 35Gy. Porém na radioterapia são aplicadas doses de radiação em frações muito pequenas, de 1 a 3Gy, num período de várias semanas. Portanto há dúvidas sobre a validade de extrapolar os parâmetros da curva de sobrevida obtidos em altas doses para regiões de baixas doses [4]. Baseado nesta observação, o objetivo deste trabalho foi testar o possível efeito radiossensibilizador destes complexos de Rh(II): acetato, citrato, trifluoroacetato; o amidato: trifluoroacetamidato e os adutos com metronidazol sobre

células de mamíferos em doses de radiação clinicamente relevantes.

II. METODOLOGIA

Síntese dos carboxilatos e amidato de Rh (II). Foi efetuada de acordo com métodos já descritos [5,6]. A síntese dos adutos com metronidazol foi realizada por vias etanólica e metanólica [7,8]

Caracterização dos compostos de Rh. Os compostos de ródio foram caracterizados por micro análise elementar e técnicas instrumentais de espectrofotometria Ultravioleta-Visível(UV-Vis), Infravermelho(IV) e Ressonância Magnética Nuclear de próton(RMN^1H). Também foram determinadas as solubilidades e as constantes de formação dos adutos com metronidazol.

Ensaios biológicos de radiossensibilização.

Determinação da citotoxicidade dos complexos. A toxicidade dos complexos foi testada *in vitro*, em cultura de células de ovário de hamster chinês (CHOk1), da American Type Culture Collection, segundo normas ISO 10993-5 e metodologia já descrita na literatura [9].

Determinação da DL_{50} *(dose de radiação que mata a metade da população celular).* Foi feita uma suspensão de aproximadamente 100 células CHOk1/mL em meio de cultura MEM-SFB (Minimum Eagle's Medium + 10% de soro fetal bovino + 1% mistura de antibióticos). Foram distribuídos 2mL desta suspensão de células em cada placa de Petri para cultura celular, de 60x15mm. Para as células se aderirem, as placas foram colocadas em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37°C durante 3 horas. Decorrido este tempo, as placas foram retiradas da estufa e o meio de cultura foi removido e substituído por 1mL da solução tampão fosfato salina, pH 7,4. As placas foram colocadas em embalagens plásticas e purgadas com N_2 durante 30 minutos, na temperatura ambiente. Após a purga, as embalagens foram seladas e levadas para irradiar durante 0; 1; 3; 5 e 10min com raios γ provenientes de uma fonte panorâmica de ^{60}Co com taxa de dose de 1,083 Gy/min num dispositivo giratório para assegurar uma irradiação uniforme.

Após a irradiação, a solução tampão foi trocada por 5mL do meio de cultura MEM-SFB fresco e as placas foram incubadas durante 7 dias em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37°C. Após este tempo, as colônias das células CHO formadas foram fixadas com formaldeído 10% em solução salina e coradas com corante de Giemsa.

A porcentagem de células sobreviventes foi calculada através da contagem do número de colônias em cada placa e comparada com o controle de CHOk1 (células não irradiadas).

Determinação do efeito radiossensibilizador dos compostos de Rh(II) [1]: A cultura de células CHO k1 foi realizada seguindo a mesma metodologia para determinação da DL_{50}. Após a adesão das células nas placas de Petri, o meio de cultura foi substituído por 1mL da solução do composto de ródio, em tampão fosfato salina pH 7,4, em concentração não tóxica. Cada composto foi testado em triplicata. A irradiação das células foi efetuada utilizando-se a mesma fonte panorâmica do ensaio anterior, durante 2,5 e 4 min, no dispositivo giratório.Após a irradiação, a solução do composto testado foi removida e substituída por 5mL de meio de cultura MEM-SFB e as placas foram incubadas e processadas como no ensaio para DL_{50}. A porcentagem de células sobreviventes também foi calculada, de acordo com o mesmo ensaio.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises elementares e as análises instrumentais: UV-Vis, IV e RMN^1H, mostraram-se bastante coerentes com os resultados teóricos.

Os carboxilatos de Rh(II): Rh_2Ac_4, Rh_2Cit_4 e Rh_2Tfa_4 e o trifluoroacetamidato: Rh_2Tfc_4 foram solúveis em água enquanto os adutos com metronidazol: $Rh_2Ac_4Metro_2$, $Rh_2Cit_4Metro_2$, e $Rh_2Tfc_4Metro_2$ foram parcialmente solúveis. O $Rh_2Tfa_4Metro_2$, não apresentando solubilidade em água, não foi submetido aos testes biológicos.

As concentrações dos complexos utilizados no ensaio de radiossensibilização foram aquelas nas quais a porcentagem de morte celular não ultrapassou 20%, obtidas no teste de citotoxicidade, para assegurar que a morte celular fosse devida à ação conjunta droga e radiação e não ao efeito tóxico do complexo.

Para determinar o possível efeito radiossensibilizador dos compostos de Rh(II), as células foram expostas a doses de radiação de 2,71 e 4,33Gy.

Os resultados do efeito radiossensibilizador são mostrados nas Figuras 1A e 1B, onde os dados de sobrevida (S) foram ajustados ao modelo linear quadrático (LQ) [10]

$$\ln S = -\alpha D - \beta D^2 \quad \text{onde,} \qquad (1)$$

S é a fração de sobrevida (número de células sobreviventes a uma determinada dose de radiação/ número de células sobreviventes na dose = zero)

D a dose de radiação

α e β constantes que definem eventos simples e duplos produzidos pela radiação, respectivamente.

.

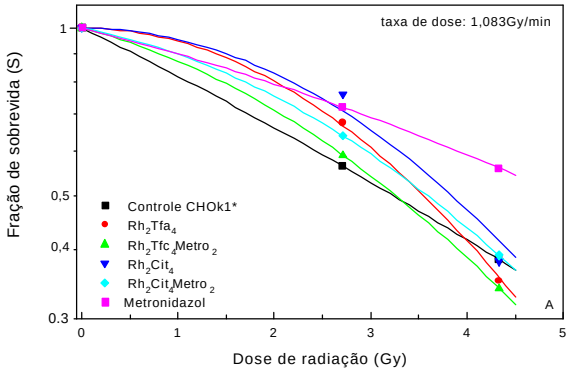

Figura 1A. Curvas de Sobrevida das Células CHOk1 Irradiadas na Presença de Compostos de Rh(II) em Ambiente Hipóxico. * Células CHOk1 irradiadas na ausência de compostos de Rh(II).

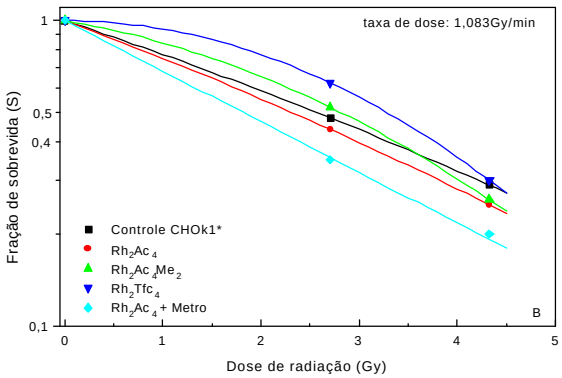

Figura 1B. Curvas de Sobrevida das Células CHOk1 Irradiadas na Presença de Compostos de Rh(II) em Ambiente Hipóxico. * Células CHOk1 irradiadas na ausência de compostos de Rh(II).

Na Tabela 1 são apresentadas as doses de radiação que provocaram 50 e 40% de sobrevida das células CHOk1 quando na ausência e na presença de complexos de Rh(II). Podemos observar que as doses de radiação necessárias para produzir uma sobrevida de 50% e 40%, são próximas ou maiores que a dose requerida para causar o mesmo efeito nas células CHOk1 controle, com exceção do acetato de ródio (Rh_2Ac_4). Este fato pode ser devido ao reparo do dano provocado pela radiação, muito comum em baixas doses, e não ao possível efeito radioprotetor, pois os valores de DMFs são muito próximos à unidade. Na radioterapia este é o motivo pelo qual são utilizadas doses fracionadas de radiação, para impedir o reparo de dano.

TABELA 1. Dose de Radiação para 50% e 40% de Sobrevida de Células CHOk1 na Presença de Complexos de Rh(II).

Composto	Dose(Gy) (S=0,5)	Dose(Gy) (S=0,4)
CHOk1 controle	3,19	4,08
Rh_2Tfa_4	3,52	4,22
$Rh_2Tfc_4Metro_2$	3,28	3,90
Rh_2Cit_4	3,88	4,40
$Rh_2Cit_4Metro_2$	3,61	4,28
Metronidazol	3,93	-
Rh_2Ac_4	2,30	2,98
$Rh_2Ac_4Metro_2$	2,86	3,40
Rh_2Tfc_4	3,30	3,79
Rh_2Ac_4+Metro	1,83	2,45

A ação dos radiossensibilizadores é medida pelo valor de ER (enhancement ratio) ou DMF (fator de modificação de dose) que é a relação da dose de radiação que provoca o mesmo efeito na ausência e presença do radiossensibilizador em ambiente hipóxico. Valores de DMF>1 indicam efeito radiossensibilizador significativo.

A partir destas curvas de sobrevida (Fig.1A e 1B), foram obtidos os DMFs de cada um dos compostos para frações de sobrevida de 50% (S=0,5) e 40% (S=0,4), apresentados na Tabela 2

TABELA 2. DMFs dos Compostos de Rh(II) e Metronidazol para Frações de Sobrevida S=0,5 e S=0,4 em Baixas Doses.

Composto	Conc. (μM)	$DMF_{0,5}$	$DMF_{0,4}$
Rh_2Tfa_4	112	0,91	0,96
$Rh_2Tfc_4Metro_2$	4	1,00	1,06
Rh_2Cit_4	84	0,83	0,94
$Rh_2Cit_4Metro_2$	12	0,90	0,98
Metronidazol	100	0,62	-
Rh_2Ac_4	11	1,13	1,12
$Rh_2Ac_4Metro_2$	12	0,89	0,98
Rh_2Tfc_4	2	0,78	0,89
Rh_2Ac_4+Metro	14 + 23	1,41	1,37

Segundo a Fig.1A e os resultados dos DMFs da Tabela 2, os compostos de Rh(II) testados não apresentaram efeito significante. Na Fig. 1B o RhAc na concentração de 11μM apresentou um DMF=1,13, que não é um valor muito significativo. Porém, em mistura com o metronidazol apresentou um efeito radiossensibilizador significante (DMF=1,41), na concentração um pouco maior, de 14μM.

Essa ação, provavelmente, independe da presença do metronidazol. Chapman e col. [11], demonstraram que o metronidazol em concentrações maiores (500μM) apresentou efeito radiossensibilizador em baixas doses de radiação.

Ao se medir o efeito radiossensibilizador dos adutos com metronidazol, verificou-se que não havia

mudança significativa dos DMFs em relação ao carboxilato de Rh(II) livre. Em função disso, aventamos a hipótese de que os adutos poderiam estar sofrendo uma decomposição quando em solução. Com esta finalidade foi medida a constante de formação dos adutos com metronidazol e como resultado dessas medidas, foram obtidos diagramas de distribuição de espécies [12], os quais confirmaram a decomposição. Isto em parte explica o fato de que a atividade radiossensibilizadora dos adutos é similar àquela obtida com os carboxilatos livres.

As propriedades radioprotetoras de tióis (RSH) e aminotióis são conhecidas, sendo geralmente atribuídas ao seu efeito de extinguir os radicais induzidos pela radiação. Os compostos que removem os tióis, aumentam o tempo de vida dos radicais e podem apresentar propriedades sensibilizadoras, este seria o caso dos carboxilatos de Rh(II) os quais reagem muito bem com compostos sulfidrílicos, como a glutationa, considerada um excelente radioprotetor natural.

Dentre os compostos de Rh(II) testados o Rh_2Ac_4 (14μM), apresentou efeito radiossensibilizador semelhante àquele demonstrado por Chibber[3], com a vantagem de se utilizar doses de radiação significantemente menores. Este efeito radiossensibilizador do Rh_2Ac_4 devido a sua reação com os tióis endógenos, afeta o reparo do dano pela radiação e provavelmente diminui o incremento da radiorresistência, mecanismos estes citados por Skov e col.[13] em baixas doses.

IV. CONCLUSÃO

Dos compostos testados, em baixas doses, o Rh_2Ac_4 apresentou efeito radiossensibilizador provavelmente devido à sua reação com os tióis endógenos, afetando o efeito de reparo do dano provocado pela radiação.

AGRADECIMENTOS

- CNPq pela bolsa de estudos.
- Engenheira Elizabeth S. R. Somessari pelas irradiações.
- Supervisão de Radiobiologia do IPEN, pela infra-estrutura cedida.

REFERÊNCIAS

[1] Goodgame, D., Lawrence, A., Slawin, A., Williams, D., **Synthesis, Characterisation and radiosensitizing properties of some nitroimidazole adducts of rhodium(II) carboxylates; x-ray structure of $\{Rh(CH_3CO_2)_2$-[1-(2-hydroxy-3-methoxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole]$\}_2$,** Inorganica Chimica Acta, vol 125, p. 143-149, 1986.

[2] Skov, K.A., **Modification of radiation response by metal complexes: a review with emphasis on nonplatinum studies**, Radiat. Research, vol. 112, p. 217-242, 1987.

[3] Chibber, I., Stratford, J., O´Neill, P., Sheldon, P.W., Ahemd, I., Lee, B., **The interaction between radiation and complexes of cis-Pt (II) and Rh(II): studies at the molecular and celular level**, Int. J. Radiat. Biol., vol. 48, N°4, p. 513-524, 1985.

[4] Watts, M.L., Hodgkiss, R.J., Jones, N.R., Fowler, J.F. , **Radiosensitization of Chinese Hamster cells by oxygen and misonidazole at low ray doses**, Int. J. Radiat. Biol, vol 50, N° 6, p. 1009-1021, 1986.

[5] Espósito, B.P., **Estudo dos produtos de reação entre carboxilatos de ródio (II) e amidas**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil, 1997.

[6] Souza, A.R., **Cicloalcanocarboxilatos de ródio (II). síntese, estudos espectroscópicos, termoanalíticos e avaliação do potencial antitumor**, Tese de Doutoramento, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil, 1995.

[7] Nothenberg, M.S., **Adutos de carboxilatos de ródio (II) com nitroimidazóis: síntese, caracterização e avaliação do potencial antichagásico**, Tese de Doutoramento, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil, 1989.

[8] Dyson; T.M., Morrison, E.C., Toecher, D.A., Dale, L.D., Edwards, D.I., **Metal complexes of radiosensitization drugs: the characterization of the metronidazole adducts of dirhodium (II) tetracarboxylate compounds**, Inorganica Chimca Acta, vol 169, p. 127-131, 1990.

[9] Rogero, S.O., Braga, F.J.C. and Higa, O.Z., **Cytotoxicity test for bioceramics of calcium phosphate.** Mater.Sci.Forum, vol. 299-300, p. 44-47, 1999.

[10] Chadwick, K.H., Leenhouts, H.P., **A molecular theory of cell survival**, Phys. Med. Biol., vol. 18, p. 78-87, 1973.

[11] Chapman, J.D., Gillespie, C.J., Reuvers, A.P. e Dugle, D.L., **The inactivation of Chinese Hamster cells by x rays: the effects of chemical modifiers on single and double-events**, Radiation Research, vol. 64, p. 365-375, 1975.

[12] Carneiro da Cunha, A.M., **Estudos sobre a formação de complexos de Fe(II) e Fe(III) com di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH) e sua aplicação no desenvolvimento de métodos analíticos**. Tese de doutoramento, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil, 1998.

[13] Skov, K.A., MacPhail, H.S., Marples, B., **The effect of radiosensitizers on the survival response of hypoxic mammalian cells. the low x-ray dose region, hypersensitivity and induced radioresistance**, Radiation Research, vol. 138, p. S113-S116, 1994.

ABSTRACT

Radiosensitizers are chemical agents which enhance the radiation sensitivity of hipoxic tumor cells aiming to better radiotherapy efficacy in the treatment of cancer. The rhodium complexes tested in this work were the carboxylates Rh_2Ac_4, Rh_2Tfa_4, Rh_2Cit_4, the amidate Rh_2Tfc_4 and the metronidazole adducts $Rh_2Ac_4Metro_2$, $Rh_2Tfc_4Metro_2$ and $Rh_2Cit_4Metro_2$. The radiosensitizing effects of these Rh(II) complexes were tested *in vitro* by irradiation of Chinese Hamster CHOk1 cells under hypoxic atmosfere in the presence of the complexes, using gamma rays from a ^{60}Co source and doses of 2,7 and 4,3 Gy. A cytotoxicity test has been performed to determinate the non-toxic concentrations of these compounds, in order to rule out the possibility of cell death induced by the complexe toxicity. A dose of 2,7Gy showed no interesting effects but under a 4,7Gy dose the complex Rh_2Ac_4 showed a higher radiosensitizing effect than the other compounds and close to previously reported effects which required high radiation doses.