AVALIAÇÃO DE CASPASES NA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS

Laura Stolz Cruz (PROVIC), Flávio Luis Beltrame (Orientador), e-mail: flaviobeltra@gmail.com, Luiza Stolz Cruz (Coorientadora - Doutoranda/PPGCF/UEPG)

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Área e subárea do conhecimento: Ciências da saúde; Farmácia; Farmacognosia.

Palavras-chave: Leucemia mieloide aguda, Euphorbiaceae, Caspase.

Resumo

Leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença a qual ocorre a proliferação anormal das células progenitoras da linhagem mieloide. *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) tem seu uso popular como uma garrafada preparada a partir do látex, para tratamento de diversas doenças, incluindo leucemia. Alguns estudos demostraram a atividade citotóxica atribuída ao látex e suas frações, porém não elucidam os mecanismos relacionados com a atividade descrita. Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade de caspases na ação citotóxica do látex de *E. umbellata* (Pax) Bruyns. Para isso, células da linhagem HL-60 foram tratadas, por 4 horas, com as subfrações diclorometano (10 e 20 µg/mL) e etanol (37,5 e 75 µg/mL) obtidas a partir do látex de *E. umbellata*. A atividade das caspases foi determinada com auxílio do reagente CellEvent™ Caspase 3/7 e analisada em microscópio de fluorescência. As subfrações diclorometano e etanol ativam as caspases 3/7, indicando que a morte celular se dê por via apoptótica.

Introdução

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) caracteriza-se por uma doença clonal do tecido hematopoiético, a qual ocorre a proliferação anormal das células progenitoras de linhagem mieloide, resultando na produção insuficiente de células sanguíneas normais e maduras (CARVALHO, 2011).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, o INCA, em 2018, a estimativa de novos casos de câncer na população brasileira era de 10.800, sendo desses 5.940 casos em homens e 4.860 casos em mulheres, com isso, a leucemia ocupa posição de destaque em ambos os sexos ente os tipos de câncer mais incidentes no país.

O tratamento da LMA é realizado através da terapia de indução e da quimioterapia de consolidação (BRASIL, 2014). Estes fármacos apresentam efeitos colaterais como mielossupressão, cardiotoxicidade, elevação das enzimas hepáticas e edema pulmonar (BRUNTON *et al*., 2012). Diante disso, é relevante a pesquisa de novos fármacos antineoplásicos, e uma das alternativas é o uso de compostos oriundos de plantas medicinais, como, por exemplo, a *Euphorbia umbellata.*

A *E. umbellata* (Pax) Bruyns, pertencente à família Euphorbiaceae, é conhecida popularmente como “janaúba” e tem seu uso popular como garrafada do látex para tratar diversas doenças, incluindo leucemia (LUZ *et al*., 2016).

A atividade citotóxica do extrato bruto e de frações obtidas a partir das cascas do caule de *E. umbellata* foram avaliadas frente as células da linhagem Jurkat

ISSN 1676-0093

(leucemia linfocítica aguda humana), tendo como resultado que a fração clorofórmio foi a mais citotóxica (KANUNFRE *et al*., 2017).

Em ensaios *in vitro* também se verificou uma diminuição do crescimento e da viabilidade celular das linhagens B16F10 (melanoma), corroborados por testes *in vivo* que demonstraram que o látex de *E. umbellata* foi capaz de diminuir em 40% no tamanho de tumores em camundongos (DE OLIVEIRA *et al*., 2013)

Entretanto, ainda são escassas as informações sobre os mecanismos de ação do látex de *E. umbellata* sobre as linhagens leucêmicas.

A elucidação do mecanismo de morte celular é fundamental para desenvolvimento de novos antitumorais (PEREIRA, 2014). A morte celular pode ocorrer de duas principais formas principais: necrose e apoptose (KUMAR *et al.,* 2010). A apoptose (morte fisiológica celular) pode ocorrer através de duas vias principais: extrínseca e intrínseca (MONTEIRO, 2015).

Na via extrínseca, há ativação de receptores de fator de necrose tumoral (FNTr), que promove ativação de caspase 8, consequentemente ativa caspases efetoras, como a caspase 3 e 7, levando a morte celular (JULIEN E WELLS, 2017). Já na via intrínseca ocorre a liberação do citocromo C mitocondrial formando o complexo apopsome. Com isso há início da cascata de reações com envolvimento das caspases 3 e 9 (MONTEIRO, 2015). Assim, a ativação de caspases especificas está relacionada ao processo de morte celular por apoptose, indicando ainda se essa morte se dá por via extrínseca ou intrínseca.

Conforme o que foi exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar atividade de caspases na ação citotóxica das subfrações diclorometano e etanol do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.

Material e Métodos

Células HL-60 foram plaqueadas na concentração de $4x10^5$ células/mL. Após 24 horas foram adicionadas as amostras: subfrações diclorometano (10 e 20 µg/mL) e etanol (37,5 e 75 µg/mL). Como controles foram utilizados solução de DMSO (0,3%) e doxorrubicina (85 nM). Após 4 horas de tratamento, as células foram transferidas para tubos de 2 mL, centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e sobre o pellet celular foram adicionados 100 µL de reagente CellEvent™ Caspase 3/7 (2 µM em PBS). O material foi incubado por 1 hora antes da análise em microscópio de fluorescência. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Resultados e Discussão

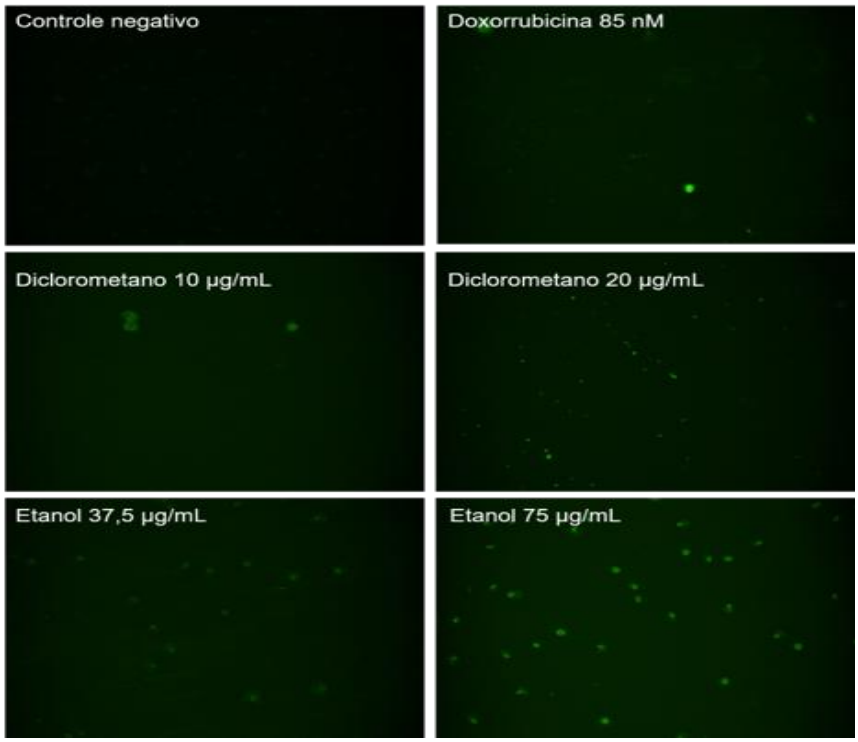
O reagente CellEvent™ Caspase 3/7 consiste em um peptídeo de quatro aminoácidos (DEVD) conjugado com um corante de ligação ao ácido nucleico. Este substrato permeável às células é não fluorescente, porque o peptídeo DEVD inibe a capacidade do corante de se ligar ao DNA. Após ativação de caspase 3 ou 7, o peptídeo DEVD é clivado, permitindo que o corante se ligue ao DNA e produza uma resposta fluorogênica com um máximo de absorção em 502 nm.

A figura 1 representa as fotomicroscopias do controle negativo, controle positivo e das células tratadas com as subfrações diclorometano e etanol.

Pode-se observar que ambas as subfrações ativam as caspases, já que foi observado fluorescência em relação ao controle negativo. Nas maiores concentrações das subfrações (diclorometano 20 µg/mL e etanol 75 µg/mL) tem-se aumento da fluorescência, sugerindo ativação mais intensa da caspase 3/7, processo associado à morte celular por apoptose.

ISSN 1676-0093

Figura 1 – Fotomicroscopia de células HL-60 após tratamento com as frações diclorometano e etanol.



Como controle negativo foi utilizado solução de DMSO em meio RPMI 1640 (0,3%). Todas as fotomiscroscopias foram obtidas no aumento de 20x.

Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com resultados de avaliação da expressão de caspases 3 e p53 em células da linhagem HCT-116 tratadas com extratos hidroalcoólico e hexânico de partes aéreas *Euphorbia tirucalli*; houve um aumento da expressão da caspase 3 nas células tumorais expostas aos extratos, sendo mais evidente no tratamento com o extrato hidroalcoólico (ARCHANJO *et al*., 2016).

Em estudo semelhante, o extrato aquoso de *Euphorbia esula* foi utilizado para induzir o processo de apoptose nas células da linhagem SGC-7901 e verificou que a atividade das caspases 8 e 3 foram aumentadas aproximadamente em 1,73 vezes e 1,98 vezes, respectivamente, sugerindo que o extrato de *E. esula* induz a apoptose de maneira a sinalizar a via extrínseca (FU *et al*., 2016).

O efeito de indução de apoptose dos extratos hexânicos das partes aéreas de *Euphorbia microciadia, Euphorbia heteradenia e Euphorbia osyridea* foi avaliado frente a três linhagens de células, a HeLa, K-562 e Fen, respectivamente. Foi possível verificar que os extratos, na concentração 50 µg/mL, induziram apoptose nas células tratadas, levando ao aumento da atividade da caspase 3, sugerindo que os extratos das plantas possuem um potencial efeito na indução da apoptose nas células estudadas (SHEKOFTEH *et al.,* 2017).

Conclusão/ões

As subfrações diclorometano e etanol provenientes do látex de *E. umbellata* ativam caspases 3 e/ou 7, causando apoptose de células HL-60.

Agradecimentos

Agradeço ao professor Flávio L. Beltrame por me proporcionar este aprendizado que agregará para minha formação acadêmica e por acreditar no meu

potencial. À professora Carla que, gentilmente, permitiu que seu laboratório fosse utilizado para os experimentos práticos, e a minha coorientadora, a doutoranda Luiza S. Cruz que me acompanhou e me auxiliou nos experimentos durante a realização do meu estágio de iniciação cientifica.

Referências

ARCHANJO, A. B.*et al*. Evaluation of citotoxicity and expression of caspase-3 an P53 in HCT-116 cells of lineage treated with different extracts of *Euphorbia tirucalli* L. **Archives of Veterinary Science**, Espírito Santo, v. 21, n. 4, p. 35-45, 2016.

BRASIL. Portaria nº 840, de 08 de setembro de 2014. Aprova as Diretrizes Diagnosticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda de Crianças e Adolescentes. **Ministério da Saúde – Secretaria de Atenção à Saúde**., 2014.

BRUNTON, L.L; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CARVALHO, Q.G.S; PEDROSA, W.A; SEBASTIÃO, Q.P. Leucemia mieloide aguda versus ocupação profissional: perfil dos trabalhadores atendidos no Hospital de Hematologia de Recife. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, 2011.

DE OLIVEIRA, T.L. *et.al*. Antitumoral effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiacear) latex. **Journal of Ethnopharmacology**, 2013.

FU, Z.Y. *et al*. Apoptosis of human gastric carcinoma cells induced by *Euphorbia esula* latex. **World Journal of Gastroenterology**, 2016.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer: Leucemia. Rio de janeiro. 2018.

JULIEN, O.; WELLS, J.A.; Caspases and their substrates. **Nature: Cell death and Differantiation**. 2017.

KANUNFRE, C.C. *et al*. *Euphorbia umbellata* bark extract – an in vitro cytotoxic study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2017.

KUMAR, Y. *et al.* **Patologia – Bases Patológicas das doenças – Robbins e Contran**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LUZ, L.E.C. *et al.* Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology**, 2016.

MONTEIRO, L.P. Determinação da atividade citotóxica do extrato vegetal de *Croton urucuracam* Bail em linhagens de células tumorais. Tese – Universidade Feederal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2015.

SHEKOFTEH, N.; BOROUJERDNIA, M.G.; KHOSRAVI, N.; KALANTAR, K.; MALEK-HOSSEINI, S.; NAMDARI. H.; AMIRGHOFRAN, Z. Apoptosis-inducing effect of the haxane extracts from three native Iranian Euphorbia plants. **Internacional Journal Of Cancer Management**, v. 10, n. 11, p. 1-9, 2017.