# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO TRITERPENO TETRACÍCLICO EUFOL

Kizzy Simão dos Santos Rocha(PIBIC/CNPq), Thais Latansio de Oliveira, Katia Paludo(Orientadora), e-mail: katiapaludo@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de biologia estrutural, molecular e genética

**Palavras-Chave:** apoptose, necrose, HRT-18, 3T3, B16F10.

**2.06.00.00-3 Morfologia 2.06.01.00-0 Citologia e Biologia Celular**

## Resumo

O triterpeno tetracíclico eufol é largamente descrito como constituinte majoritário em espécies de plantas da família Euphorbiaceae. Muitos estudos atribuem a esta substância importantes atividades biológicas com anti- inflamatória, antiproliferativa e capacidade de promover seletividade na apoptose nas células de alguns cânceres. Avaliação antitumoral do Eufol, em células tumorais com elevada incidência como o de cólon e do melanoma, pode configurar como futura alternativa terapêutica para essas patologias. Os resultados desse subprojeto mostraram que o tratamento Eufol apresentou citotoxicidade para as linhagens tumorais e a normal testadas e induziu alterações morfológicas importantes como arredondamento celular, condensação de cromatina e formação de blebs. Entretanto apenas concentrações consideradas elevadas para uma substância isolada apresentaram efeitos citotóxicos.

## Introdução

O triterpeno tetracíclico eufol é largamente descrito como constituinte majoritário em espécies de plantas da família Euphorbiaceae (YASUKAWA *et al*., 2000; MATA *et al*., 2011; TSOPMO *et al*., 2011; DUTRA *et al.,* 2012). Muitos estudos atribuem a esta substância importantes atividades biológicas como a anti-inflamatória, na qual o eufol foi eficaz na redução de doenças intestinais e em doenças autoimunes do sistema nervoso central, quando administrado oralmente em ratos (DUTRA *et al*., 2012). Ainda seguindo essa linha de atividade biológica, Lin *et al*. (2012) avaliando esta substância em tumores gástricos, demonstraram que o eufol apresenta efeitos antiproliferativos e promove seletivamente a apoptose nas células gástricas cancerosas. Eles ainda afirmam que o eufol é um agente potencialmente promissor para o desenvolvimento na quimioterapia contra o câncer gástrico em humanos e que a especificidade de direcionamento do eufol para células cancerosas podem conduzir à redução dos efeitos secundários tóxicos em pacientes com câncer. Considerando esses dados, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar a atividade citotóxica do eufol em diferentes linhagens de células tumorais e uma normal.

## Material e Métodos

*Cultivo Celular:* Os ensaios foram realizados em células humanas de carcinoma de cólon (HRT-18), melanoma murino (B16F10) e fibroblasto murino (3T3, não tumoral) crescidas em meio RPMI, com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptamicina e mantidas a 37$^{o}$C, sob atmosfera de 5% de $CO_2$.

*Ensaios de Citotoxicidade*: As células foram semeadas em placas de 96 poços (3.000/poço) e após 24 horas foram submetidas as diferentes concentrações de Eufol, o ensaio de citotoxicidade ocorreu através de retenção de vermelho neutro em lisossomos e com o reagente MTT (brometo de (3-metil- [4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio. Após 48 e 72 horas foi realizado leitura da absorbância para cada ensaio.

*Análise Morfológica*: Para ensaio de morfologia celular, as células foram adicionadas (2,5x10$^{3}$) em placa de 24 poços contendo uma lamínula de vidro redonda. Após 72 horas de tratamento com diferentes concentrações do eufol as células foram coradas, montadas sobre lâmina, seladas com esmalte e posteriormente analisadas em microscópio óptico Olympus EX-41.

*Análise estatística*: Os resultados para os ensaios de citotoxicidade foram apresentados como média ± erro padrão da média de 3 ensaios diferentes. Os dados foram testados para distribuição normal e posteriormente analisados utilizando ANOVA de uma via e pós teste de Tukey ($p<0,05$).

**Resultados e discussão**

O ensaio de citotoxidade, mostrou uma diminuição estatisticamente significativa na absorbância do vermelho neutro a partir da concentração 3,1µg/mL Eufol e com MTT a partir de 50 µg/mL na linhagem de fibroblasto 3T3 após 48h de tratamento. Com 72 h o decréscimo da absorbância ocorreu em ambos os testes com a concentração de 3,1 µg/mL. Na linhagem melanoma murino, B16F10, com 48 h houve redução significativa da absorbância a partir da concentração 6,2 µg/mL com vermelho neutro e com MTT a partir de 25µg/mL. Nas 72h seguintes manteve a diminuição da absorbância com os mesmos níveis de concentração das 48 h. Na linhagem de carcinoma do colo retal, HRT18, nas 48h a diminuição da absorbância ocorreu na concentração 25µg/mL com vermelho neutro e já com MTT 72 µg/mL. No tempo de 72h foi a partir da concentração 3,1 µg/mL com vermelho neutro e com MTT 25 µg/mL.

Já nos ensaio morfológico, foi possível observar as células da linhagem não tumoral de fibroblasto murinho, 3T3, tratadas com as concentrações de 100, 75 e 50 µm/mL apresentaram drástica redução número de células, além de alterações morfológicas importantes como condensação de cromatina, arredondamento celular e formação de blebs. O resultado com as células das linhagens de melanoma murino B16F10 e carcinoma colo-retal humano, HRT-18 mostrou que, além das concentrações do eufol 100, 75 e 50 µg/mL, a concentração de 25 µg/mL também reduziu drasticamente o número de células com indução de condensação da cromatina, arredondamento celular, formação de blebs e estruturas diminutas com núcleo e citoplasma, compatíveis com corpos apoptóticos.

Diversas metodologias *in vitro* vem sendo amplamente utilizadas para realizar o *screening* de substâncias tóxicas à diferentes tipos de células. Com isso, é possível avaliar a citotoxicidade de diversos compostos, ou seja, da habilidade de uma substância induzir a morte celular através do dano de suas funções básicas. Entre essas metodologias, os ensaios de citotoxicidade são æs mais utilizadas em ensaios preliminares com substâncias cujo potencial ainda é desconhecido, como o Eufol.

O Eufol é um metabólito secundário importante em espécies de plantas da família Euphorbiaceae (YASUKAWA et al., 2000; MATA et al., 2011; TSOPMO et al., 2011; DUTRA et al., 2012) e é classificado como um triterpeno tetracíclico. Os terpenos são conhecidos pela sua potencial atividade antitumoral. O taxol, também conhecido como paclitaxel, por exemplo, é um diterpeno lactâmicos tetracíclicos que foi isolado pela primeira vez a partir da casca, raízes e ramos de *Taxus brevifolia* (ELAVARASI et al, 2012). Este composto é a primeira droga bilionária anticâncer do mundo, e é usada para tratar um grande número de doenças proliferativas de tecidos humanos (VENNILA et al 2012). Vários triterpenos, incluindo os ácidos usólicos e oleanólico, ácido betulínico, celastrol, primistimerina, lupeol e outros apresentam comprovada atividade antitumoral (PETRONELLI et al, 2009). No presente trabalho o Eufol apresentou atividade citotóxica e indução de importantes alterações morfológicas nas linhagens tumorais B16F10 e HRT18. Entretanto, os mesmos efeitos foram observados para a linhagem não tumoral 3T3 e as concentrações que apresentaram citotoxicidade foram elevadas para uma substância isolada.

**Conclusão**

Os resultados mostraram que o Eufol apresentou citotoxicidade para as linhagens tumorais testadas a partir de uma concentração de 3,1µg/mL e que o teste com vermelho neutro foi mais sensível que a técnica de MTT para detecção da diminuição da viabilidade. Foi possível observar também, como resultado, que o Eufol foi capaz de induzir alterações morfológicas importantes e redução da celularidade para as linhagens testadas a partir de uma concentração 25µg/mL. Infelizmente o tratamento com o Eufol apresentou citotoxicidade para a linhagem não tumoral de fibroblasto, 3T3, nas mesmas concentrações que para as linhagens tumorais. Além disso, para que uma substância isolada apresente potencial para tratamento antitumoral ela precisa apresentar efeitos citotóxicos em concentrações menores do que os apresentados nesse trabalho.

**Agradecimentos**

Á professora Katia Paludo pela orientação cuidadosa do trabalho e pelo conhecimento transmitindo durante o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço também ao CNPQ pela oportunidade de realizar este trabalho com auxílio financeiro na forma de bolsa de iniciação científica.

**Referências**

DUTRA, Rafael Cypriano et al. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: evidence for the underlying mechanisms. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 531-542, 2012

ELAVARASI, A.; RATHNA, G.S.; KALAISELVAM, M. Taxol producing mangrove endophytic fungi Fusarium oxysporum from *Rhizophora annamalayana*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. Vol.2. p.s1081-s1085. 2012.

HASSAN, E.M., MOHAMMED, M.M.D., MOHAMED, S.M. Two New Phorbol-Type Diterpene Esters from *Synadenium grantii* Hook f. Leaves. **Records of Natural Products**. Vol.6, p.255-262. 2012.

LIN, M.W.; LIN, A.S.; WU, D.C.; WANG, S.S.; CHANG, F.R.; WU, Y.C.; HUANG,Y.B. Euphol from Euphorbia tirucalli selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. F**ood Chem Toxicol.** 2012 vol.12, p.4333-4339. 2012.

MATA, R.S.C., MENDONÇA, D.I.M.D., VIEIRA, L., SANTOS, A.F., SILVA, L.A., GASPAR, J.F., MARTINS, C., RUEFF, J., SANT'ANA, A.E.G., Molluscicidal. Activity of Compounds Isolated from *Euphorbia conspicua* N. E. Br. **Journal of the Brazilian Chemical Society** vol. 22, p.1880-1887. 2011.

MOREIRA, C.P. S., ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A. Atividade moluscicida do látex de *Synadenium carinatum* boiss. (Euphorbiaceae) sobre Biomphalaria glabrata e isolamento do constituinte majoritário. **Revista eletrônica de Farmácia** vol.7, p.16-27. 2010.

PETRONELLI, A.; GAETANO, P.; TESTA, U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. **Anti-cancer drugs**. Vol.20. p. 880-892. 2009.

TSOPMO A., KAMNAING, P. Terpenoids constituents of *Euphorbia sapinii*. **Phytochemistry Letters** vol.4, p.218–221. 2011.

PENG, Q., LI., G., MAA, Y., HUANG, J., WEI, X., WANG, J., Chemical constituents of *Euphorbia kansui.* **Biochemical Systematics and Ecology** vol.43, p.64–66. 2012.

VENNILA, F.; KAMALRAJ, S.; MUTHUMARY, J. In vitro studies on anticancer ativity of fungal taxol against humam breast cancer cell line MCF-7. **Biomecidine Anging Pathology**. Vol.2, p.s1159-s1161. 2012 YASUKAWA, K., AKIHISA, T.,

YOSHIDA, Z.A., TAKIDO, M., Inhibitory Effect of Euphol, a Triterpene Alcohol from the Roots of *Euphorbia kansui*, on Tumour Promotion by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate in Two-stage Carcinogenesis in Mouse Skin. **Journal of Pharm and Pharmacology** vol.52, p.119–124. 2000.