AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FRAÇÃO HEXÂNICA DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* EM LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA

Gabrielle Silveira de Campos (PROVIC/UEPG), Luiza Stolz Cruz, Flávio Luís Beltrame, Priscileila Colerato Ferrari (Orientadora), e-mail: priscileila@hotmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas-Setor de Ciências Biológicas e da Saúde

Área: Farmácia e subárea: Farmacotecnia
Palavras-chave: câncer, HL-60, MTT.

Resumo
A pesquisa de fármacos para tratamento de neoplasias possui grande relevância visto que, o câncer é um problema de saúde pública. Entre os tipos de câncer, encontra-se a leucemia, uma doença originada na medula óssea. Atualmente o tratamento de quimioterapia possui alto valor agregado, pode ser teratogênico para células normais e possuir efeitos colaterais. Este trabalho visa avaliar a citotoxicidade da fração hexano e subfrações do látex de *E. umbellata* frente às células leucêmicas HL-60. A partir do látex do caule foi realizado o fracionamento com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol e o refracionamento da fração de hexano utilizando éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol. O efeito citotóxico foi avaliado pelo método do MTT utilizando células HL-60, o tratamento foi realizado, por 72 horas, com diferentes concentrações de fração de hexano. As subfrações apresentaram resultados mais potentes do que a fração originária hexano (com exceção da subfração éter). Contudo é necessário aprofundar os conhecimentos a fim de se desenvolver estudos de indicação terapêutica.

Introdução
A pesquisa por novos fármacos para tratamento de neoplasias possui grande relevância nos dias de hoje visto que o câncer é um problema de saúde pública. Estima-se que aproximadamente 80% dos mais de 20 milhões de casos novos das diferentes doenças estimados para 2025, sejam relacionados ao câncer (IARC, 2012). Entre os tipos de câncer, encontra-se a leucemia, um tipo de doença originada na medula óssea e responsável por 4910 mortes no ano de 2014 (INCA, 2016). A leucemia promielocítica aguda (LMA - M3) é caracterizada pelo aumento rápido de promielócitos anormais no sangue. Um modelo para estudar a diferenciação de células mieloides humanas é realizado com a linhagem HL-60. (SAGRILLO et al., 2005). Atualmente o tratamento de quimioterapia adotado para a LMA-M3 consiste em associar compostos quimioterápicos que possuem alto valor agregado, entretanto podem ser mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos para células normais (LO-COCO, DONATO, SCHLENK, 2016).
A *Euphorbia umbellata* (Pax) Bryuns é uma planta arbustiva, nativa da África tropical (OLIVEIRA, RODRIGUES, LACERDA, 2005), ficou conhecida popularmente na região sul do Brasil como janaúba e “leitosinha” e é utilizada na forma de garrafada, empregada para o tratamento do câncer. Estudos têm mostrado a atividade citotóxica dos extratos de *E. umbellata* e sua seletividade em células de origem leucêmica (CAMARGO et al., 2015; LUZ et al., 2016). Nos extratos dessa planta já

foram identificados flavonoides, saponinas, terpenos, ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lectinas e glicoproteínas (OLIVEIRA et al., 2013).

Materiais e Métodos

Foi realizada a coleta de látex na cidade de Ponta Grossa (PR) através de incisões longitudinais no caule da planta, e armazenado sob refrigeração. O fracionamento do látex foi realizado na forma exaustiva utilizando extrator de *soxhlet* e os solventes utilizados foram adicionados em polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol). As quatro frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C e mantidas sob refrigeração (± 4°C) até o momento do uso. Também foi realizado o refracionamento da fração hexano utilizando éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol. O solvente das subfrações extraídas foi eliminado com auxílio de rota-evaporador a pressão reduzida. As subfrações foram armazenadas, sob refrigeração, até o momento do uso.

As amostras biológicas utilizadas foram células humanas de leucemia mieloide pró mielocítica aguda (HL-60), obtidas junto ao Profº Dr. Rui Curi do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Na UEPG, as culturas de células foram mantidas no laboratório de Fisiologia Humana, através de expansão contínua em meio de cultura RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 20 mM de Bicarbonato de Sódio, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (100000 U/mL e 10 mg/mL, respectivamente) em estufa a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2. As células leucêmicas foram contadas através da coloração de azul de *Trypan* e deveriam apresentar no mínimo 90% de viabilidade. Estas foram semeadas em $0,5x10^5$ células/poço em placas de 24 poços. O início do tratamento foi aplicado após 24 horas em concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10 e 25 µg/mL obtidas a partir de uma solução estoque de 25 mg/mL em DMSO (dimetilsulfóxido) P.A. O tempo de tratamento foi de 72 horas e após, as células foram homogeneizadas e transferidas para tubos de 2 mL, centrifugadas a 220 g durante 5 minutos e então, o sobrenadante foi removido. Sobre o precipitado foi adicionado reagente azul de tetrazólio (MTT) na concentração de 0,5 mg/mL, seguido de ressuspensão e incubação por 30 minutos em estufa mantida a 37 °C e 5% de CO_2. Então o conteúdo foi novamente centrifugado a 900 g por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou 300 µL DMSO P.A. no precipitado para que houvesse solubilização dos cristais de *formazan* formados. As soluções foram transferidas para placas de 96 poços e suas absorbâncias foram determinadas em espectrômetro a 550 nm. A análise estatística com os valores experimentais foi expressa como a média + o desvio padrão. Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade foram analisados pela diferença de significância estatística experimental usando a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. O nível de $P \leq 0,05$ foi utilizado para determinar a significância estatística. Os testes foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

O efeito citotóxico da fração hexânica e das subfrações foi avaliado pela metodologia do MTT (Brometo de (3-(4,5 dimetil tiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazolio), a qual se caracteriza como ensaio colorimétrico baseado na redução enzimática da molécula de MTT para formazan em células viáveis. O resultado da redução é uma

mudança de cor da molécula de MTT. A figura 1 presenta os resultados de resposta do tratamento das células HL-60 com a fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata*. Observa-se que houve um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da concentração avaliada, porém, desde a menor concentração testada já é verificada uma redução de mais de 50% da viabilidade celular.

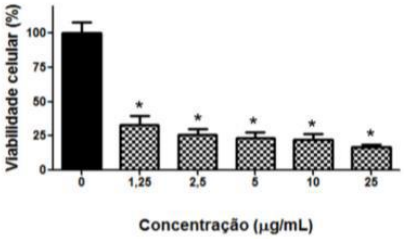


Figura 1- Resultado da viabilidade celular da fração hexano para a linhagem HL-60. O símbolo * representa diferença estatística (p<0,001) em relação ao controle negativo na viabilidade de células (meio RPMI + DMSO 0,25%).

O parâmetro final de avaliação foi estabelecimento pela CI_{50}, caracterizada pela concentração da substância teste que inibe 50% do crescimento celular em comparação com células de controle negativo. O valor obtido para a fração hexano foi de CI_{50} 0,061 ± 1,226 µg/mL, que indica que essa fração causa susceptibilidade das células cancerígenas ao seu contato. Trabalhos anteriores do nosso grupo (Luz et al., 2016) obtiveram resultados semelhantes quando analisada a fração hexano do látex de *E. umbellata* com células da linhagem Jurkat (leucemia linfocítica aguda), apresentando um CI_{50} menor do que 2 µg/mL quando avaliado pelo ensaio de redução de MTT, após 72 horas de tratamento. Visto o potencial citotóxico promissor da fração hexano, as suas subfrações também foram avaliadas em relação ao potencial citotóxico (Figura 2). É possível observar que a subfração de diclorometano (B) se apresentou mais eficaz, pois obteve menor valor de CI_{50} para a linhagem HL-60 e menor variação de erro padrão da média (Tabela 1). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as plantas medicinais e os extratos são considerados matrizes citotóxicas interessantes quando os extratos, medidos contra diferentes linhagens tumorais, mostram valores de IC_{50} abaixo de 30 µg/mL. (Alonso-Castro et al., 2012; Luz et al., 2016). O bom resultado obtido com a subfração de diclorometano pode estar correlacionado com a composição química da *Euphorbia* que possui triterpenos e diterpenos do tipo forbol, que já foram descritos anteriormente como citotóxicos.

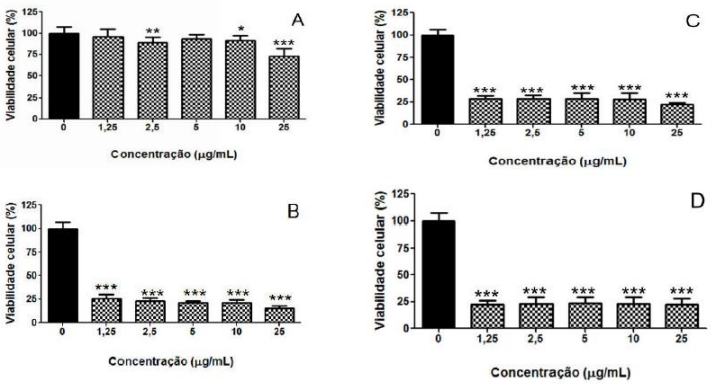


Figura 2- Efeitos das subfrações de hexano do látex de *Euphorbia umbellata* na viabilidade das células leucêmicas HL-60. Em (A) resultados da viabilidade para tratamento com a subfração éter, em (B) para a subfração de diclorometano, em (C) para a subfração de etanol e em (D) para a de metanol. Os símbolos *, ** e *** representam diferença estatística (p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente) em relação ao controle negativo (meio RPMI + DMSO 0,25%).

Tabela 1- Valores de CI_{50} (µg/mL) determinado para o tratamento com as subfrações para a linhagem HL-60.

	CI_{50} (µg/mL)
Éter	>25
Diclorometano	0,005±0,098
Etanol	0,004±0,987
Metanol	ND

Dados expressos em valor de CI_{50} ± erro padrão da média, obtidos através da análise de Probit, método de Finney. ND: não definido.

Conclusões

A fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata* obteve bons resultados para a viabilidade celular da HL-60 e para os ensaios de CI_{50}, sendo necessário pequenas concentrações para obter inviabilidade das células. Dentre as subfrações da fração hexano do látex, a mais eficaz para as células da HL-60 foi a de diclorometano, que também obteve baixos valores de CI_{50}, tornando-se promissora para estudos mais aprofundado de possíveis concentrações para o seu uso de tratamento.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Ponta Grossa por conceder a possibilidade de realizar este projeto. Ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica e ao Laboratório de Tecnologia de Fitoterápicos pelo espeço cedido, apoio e construção do meu conhecimento.

Referências

ALONSO-CASTRO, A.J, et al. Antitumor effect of *Croton lechleri* mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal Ethnopharmacology**. v. 140, p. 438–442, 2012.

CAMARGO, L. E. **Caracterização morfoanatômica, estudo fitoquímico e avaliação da citotoxicidade de *Euphorbia umbellata* (pax) Bruyns (Euphorbiaceae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Pharmaceuticals: a review of human carcinogens**. Lyon, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016:** Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2016.

LO COCO, F; DONATO, L. D; SCHLENK, R. F. Targeted Therapy Alone for Acute Promyelocytic Leukemia. **The New England Journal of Medicine.** v. 374, p. 1197-1198, 2016.

LUZ, L. E.C. Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax)Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 183, p. 29–37, 2016.

OLIVEIRA JUNIOR, R.J; RODRIGUES, C.S; LACERDA, E. P. S. Avaliação da atividade antitumoral do látex bruto de *Synadenium grantii* Hook. f. DL 50 e o tratamento in vivo via oral. in: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 57, 2005, Fortaleza. **Anais.** Disponível em: http://www.medicinacomplementar.com.br/tema9551210cex.asp.

SAGRILLO, M. R. et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Revista brasileira hematologia hemoterapia**. v. 27, p. 94-101, 2005.