ESTUDO DE POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA DE *EUPHORBIA UMBELLATA*

Alexandre Alves de Oliveira (PROVIC), Luiza Stolz Cruz (Coautora), Flávio Luís Beltrame (Orientador), e-mail: flaviobeltra@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de ciências farmacêuticas.

Ciências da saúde; Farmácia; Farmacognosia.

Palavras-chave: Euphorbiaceae, Leucemia, Apoptose.

Resumo

As leucemias são neoplasias que apresentam grande ação na medula óssea e no sangue periférico. Seu tratamento, sendo feito de maneira adequada e com o esquema terapêutico adequado, amplia a sobrevida dos pacientes em até 80%. O uso do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, tem indicação popular, como agente anticâncer. Desta forma neste trabalho se propõe uma avaliação do ciclo celular de HL-60 frente ao tratamento com frações de látex de *E. umbellata* os efeitos do tratamento no ciclo celular. As células HL-60 foram tratadas com frações diclorometano (10 e 20 µg/mL) e etanol (37,5 e 75 µg/mL). Após 12 horas, foi adicionado iodeto de propídeo, o qual foi mantido por 6 horas. Para a análise do ciclo celular foi empregada a técnica de citometria de fluxo. Os histogramas mostram um aumento de células em fase S, para a maioria dos tratamentos, exceto o tratamento com a maior concentração de etanol, que elevou a fase sub G0. Com isso tem se que a subfração diclorometano causou de forma significativa aumento da fase S e G2/M, enquanto a subfração etanol elevou a população em fase sub G0, que pode indicar um processo de apoptose.

Introdução

As plantas que são usadas no tratamento de enfermidades são facilmente encontradas em feiras ao ar livre, mercados e até mesmo nos quintais das casas, sendo seu uso com finalidade medicinal tão antigo quanto à existência da espécie humana (MACIEL et al., 2002).

Entretanto, se faz importante e necessário validar as indicações populares destas plantas medicinais e assim possibilitar o estudo, desenvolvimento e possível produção de novos fitoterápicos e fitoquímicos que poderão beneficiar a população no tratamento de diversas doenças (NOLDIN, 2005).

Dentro da gama de doenças que acometem o homem, as leucemias são uma classe de neoplasia que apresentam ampla ação na medula óssea e, em sua maioria, do sangue periférico. Praticamente todas as leucemias possuem fatores prognósticos determinados por fatores citogenéticos, mais propriamente mutações adquiridas que, uma vez detectadas, possibilitam a abordagem mais adequada a ser realizada no paciente. Sendo que, avanços na sobrevida dos pacientes, estão relacionados a adequação correta do tratamento (HAMERSCHLAK, 2008).

Estes avanços passam por melhorias farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos produtos utilizados na farmacoterapia, pois fornecem dados essenciais para avaliar a necessidade de modificações nos protocolos a serem feitas antes ou

durante a sua aplicação, evitando, assim, uma possível toxicidade excessiva e aumentando a eficácia do tratamento (CAZE et al., 2010).

A *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, tem seu látex usado na medicina tradicional como anti-inflamatório, antiúlcera, homeostático e angiogênico. Entretanto, a principal indicação popular é como agente anticâncer. Estudos evidenciam que este látex contém diversas substâncias como esteroides, terpenos, compostos fenólicos, proteínas e outras substâncias químicas, que tem acabam tendo efeito contra o câncer (KANUNFRE et al., 2017)

Apesar disso, descobrir qual o mecanismo de ação relacionado às substâncias presentes no látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns se faz necessário para entender como age e assim viabilizar o estudo de mais uma possível matriz a ser usada para o tratamento de quadros de leucemias.

Materiais e Métodos

Em um primeiro momento a coleta do látex foi realizada na cidade de Ponta Grossa, através de incisões no caule e galhos da planta. O fracionamento do látex se deu em aparato de Sohxlet, utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol como solventes extratores. Após a concentração dessas frações, a fração hexano foi refracionada, da mesma forma, porém os solventes extratores foram éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol. Todas as frações e subfrações foram armazenadas sob refrigeração até o momento do uso.

A segunda parte do projeto se deu a partir do cultivo de células humanas, linhagem HL-60 (leucemia pró mielocítica aguda), que foram usadas para a avaliação da viabilidade das células e determinação da concentração adequada para o ensaio de ciclo celular.

Uma vez determinada a concentração adequada, iniciou-se a avaliação de análise do ciclo celular. Para tanto as células foram plaqueadas, em placas de 24 poços, na concentração de 4x105 células/mL (0,5 mL/poço). Após 12 horas de incubação as células foram tratadas com subfração diclorometano (20 e 40 µg/mL) e subfração etanol (37,5 e 75 µg/mL).Após 12 h de tratamento, as células foram homogeneizadas, lavadas e ressuspensas em 200 µL de tampão PSSI (50 µg/mL de iodeto de propídio, 0.1% Triton X-100 e 50 µg/mL RNAse, preparados em tampão pH7,4) e as amostras foram lidas em citometro de fluxo..Soluções de DMSO 0,08%, em meio de cultura, foram usados como controles negativo e como controle positivo uma solução de mesilato de imatinibe 0,5µM e cloridrato de doxorrubicina 85nM. Todas as amostras foram analisadas em quadruplicata.

Os resultados foram expressos como porcentagem média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA com pós teste de Tukey.

Resultados e Discussão

Os ensaios, in vitro, de citotoxicidade demonstram-se de suma importância para elucidar os resultados de produtos naturais que tenham potencial antitumoral. (OLIVEIRA et al., 2013)

O ciclo celular é uma peça fundamental num processo carcinogênico. Sendo que neste processo, a célula pode não responder, principalmente, a estímulos que regulam a transição G1/S e, com isso, permanece no ciclo celular, dando origem a novas células que tenham essa mutação, proliferação incontrolada. Ao entender o

ciclo celular e suas fases predominantes em cada subfração descobre-se onde ocorre essa citotoxicidade (BOGO, 2012)

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos para a linhagem HL-60 tratada com as subfrações diclorometano e etanol.

Tabela 1 – Valores de média da população celular em cada fase do ciclo em HL-60 após 12 horas de tratamento com subfrações diclorometano e etanol de látex de *E. umbellata.*

Amostras	Concentração	Sub-G0	G0/G1	S	G2/M
Controle negativo		9.65±0.45	46.08±3.01	16.03±1.54	28.23±4.10
Doxorubicina	0.085 µM	8.95±0.46	22.94±2.19	29.43±1.66	34.54±1.62
Imatinibe	0.5 µM	11.06±0.61	24.97±1.46	19.59±1.34	23.72±1.18
CH_2Cl_2	20 µg/ml	12.81±0.91[a]	19.65±4.62 a	37.45±4.28[a]	44.65±4.38[a]
CH_2Cl_2	10 µg/ml	11.66±0.26	17.37±4.09[a]	42.36±4.61[a]	48.75±4.40[a]
EtOH	75 µg/ml	59.03±0.90[a]	8.372±1.75[a]	10.99±1.43	12.41±1.70[a]
EtOH	37.5 µg/ml	28.73±3.39[a]	18.52±2.60[a]	19.83±2.65	23.87±2.96

Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. [a]- em relação ao controle negativo ($p<0,05$)

A análise estatística mostrou ainda que não houve diferença em nenhuma das fases do ciclo quando comparada as duas concentrações da subfração diclorometano. Enquanto entre as duas concentrações de subfração etanol houve diferença em todas as fases do ciclo, com $p< 0.01$.

Assim como descrito em Oliveira et al. (2013) e Luz et al. (2016), as subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* causam alterações e diminuem a população de células tumorais apoiado em estudos que mostram que plantas da família Euphorbiaceae tem a capacidade de diminuir a quantidade dessas células após seu tratamento.

Conclusões

As subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* promovem alteração da proporção de células em diferentes fases do ciclo celular. A subfração diclorometano causou de forma significativa aumento da fase S e G2/M, enquanto a subfração etanol elevou a população em fase sub G0, que pode indicar um processo de apoptose.

Agradecimentos

Agradeço ao professor doutor Flávio Luís Beltrame e a Luiza Stolz Cruz que me acompanharam e me deram auxilio em toda a caminhada do projeto e a todos os colegas de laboratório que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Referências

BOGO, D.. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo de compostos de liquens**. 2012. 109 p. Tese (Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2012. Disponível em: <https://posgraduacao.ufms.br/portal/trabalho-arquivos/download/554>. Acesso em: 28 ago. 2018.

CAZE, M.O. et al. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Revista Hcpa,** Porto Alegre, v. 30, n. 1, p.5-12, 2010.

HAMERSCHLAK, N.. Leucemia: fatores prognósticos e genética. J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre, v. 84, n. 4, supl. p. S52-S57, Aug. 2008.

KANUNFRE, C.C. et al. Euphorbia umbellata bark extracts – an in vitro cytotoxic study. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 27, n. 2, p. 206-213, Apr. 2017.

LUZ, L.E.C. et al. Cytotoxic biomonitored study of Euphorbia umbellata (Pax)Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 183, p. 29-37, maio. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.025>. Acesso em: 28 aug. 2018.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, May 2002.

NOLDIN, V.F. **Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de *Simaba ferruginea* ST. HIL. e avaliação da atividade antiúlcera e antinociceptiva dos extratos e compostos isolados**. 2005. 91f. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Produtos Naturais) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina.

OLIVEIRA, T.L. de et al. Antitumoural effect of Synadenium grantii Hook f.(Euphorbiaceae) latex. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 150, n. 1, p. 263-269, out. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.033>. Acesso em: 28 aug. 2018.