AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE FRAÇÕES DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

Laura Stolz Cruz (PIBIC/CNPq/UEPG), Flávio Luís Beltrame (Orientador), e-mail: flaviobeltra@gmail.com. Luiza Stolz Cruz (Co-orientadora e Doutoranda/PPGCF/UEPG)

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Ciências Farmacêuticas.

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

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Crônica, K-562, Euphorbiaceae.

Resumo

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia que tem como característica a proliferação anormal das células hematopoiéticas, resultando em expansão clonal de célula-tronco pluripotente na presença do cromossomo Filadélfia (Ph). O tratamento dessa doença é muitas vezes custoso e ineficaz devido à resistência doença aos fármacos disponíveis hoje no arsenal terapêutico. Dessa forma busca-se cada vez mais por tratamentos alternativos, como o uso de plantas medicinais, para que se consiga encontrar outras matrizes/medicamentos capazes de atuarem no tratamento dessa doença. Nesse sentido, a espécie *Euphorbia umbellata*, conhecida popularmente como leitosinha ou janaúba, se apresenta como uma alternativa de estudo e avaliação. Sua indicação popular é para o tratamento de diferentes cânceres, incluindo a leucemia. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade de fração hexano e subfrações (éter de petróleo, diclorometano, etanol, metanol) do látex de *Euphorbia umbellata* frente ao modelo de LMC. A avaliação foi realizada através do ensaio de redução de azul de tetrazólio (MTT), para isto tratou-se as células por 72 horas com concentrações crescentes da fração e subfrações às células (1,25 – 25 µg/mL). Como resultado do teste citotoxidade, obteve-se valores de CI_{50} das frações que variaram de 1,19 a 30,61 µg/mL, destacando a fração hexano como a mais potente. Esses resultados preliminares demonstram que a frações de *E. umbellata* são promissoras para a pesquisa de novos tratamentos para a leucemia.

Introdução

Leucemia é uma doença maligna que atinge os leucócitos, geralmente de origem desconhecida. É caracterizada pelo acúmulo de células anormais na medula óssea. Classifica-se em linfoide e mieloide podendo ser aguda ou crônica (INCA, 2017).

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica caracterizada por uma proliferação do sistema hematopoiético, levando a expansão clonal de uma célula-tronco pluripotente, e pela presença do cromossomo Filadélfia (Ph).

O tratamento é feito pelo uso de Imatinibe, Desatinibe, Nilotinibe (inibidores de tirosinoquinase), Hidroxicarbamida e Interferon- α. Porém a utilização desses medicamentos leva ao surgimento de efeitos colaterais, como náuseas, retenção de líquido, cãibras e exantemas (Hoffbrand e Moss, 2013). A quimioterapia se torna longa, custosa e por vezes ineficaz como consequência de resistência. Portanto,

buscam-se tratamentos alternativos, sendo o uso de plantas medicinais um recurso para este tipo de tratamento.

A *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns pertence à família Euphorbiaceae e é facilmente encontrada na África do Sul (Mota, Benfica e Valadarez, 2012). É conhecia popularmente, no Brasil, por janaúba, cancerola, avelós de folhas, leitosinha e tem seu uso popular como garrafada com objetivo de tratar alergia, doença de Chagas, impotência sexual, lepra cólicas menstruais, obesidade, sangramentos internos e câncer, incluindo leucemia (Oliveira Jr. et al., 2005; Cunha, et al, 2009; Munhoz et al., 2014).

No estudo conduzido por Luz et al. (2016) foi possível observar que frações de látex de *E. umbellata* possuem atividade citotóxica elevada contra três linhagens celulares e, também, que a fração hexano exibiu efeito elevado contra células da linhagem Jurkat (modelo de leucemia).

Conforme o que foi apresentado, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade citotóxica da fração hexano e suas subfrações obtida do látex de *E. umbellata* frente ao modelo de leucemia mieloide crônica.

Materiais e Métodos

Avaliação citotóxica foi determinada pela realização do ensaio de redução de azul de tetrazólio (MTT), que consiste em medir indiretamente a viabilidade celular a partir da atividade enzimática mitocondrial.

Para o cultivo celular foram utilizadas células humana K-562, mantidas 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% da solução de penicilina-estreptomica (100000 Ul/mL-10 mg/mL respectivamente) e encubadas em estufa a 37ºC em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2.

As células, na concentração $1x10^5$ células/mL, foram plaqueadas (500 µL) em placas com 24 poços. Após 24 horas, foram tratadas com 500 µL de concentrações crescentes (1,25 – 25 µg/mL) da fração hexano e de subfrações (éter de petróleo, diclorometano, etanol, metanol) a partir de uma solução estoque de 25 mg/mL em DMSO (dimetilsulfóxido), cuja concentração final oi 0,1%. Depois de 72, as células foram homogeneizadas e transferidas para tubos de 2mL, centrifugadas por 5 minutos. Substituiu-se o meio de cultura por 400 µL de solução de MTT com concentração 0,5 mg/mL e incubou-se em estufa a 37ºC em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 por 30 minutos.

Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos e removeu-se o sobrenadante. Posteriormente adicionou-se 300 µL de DMSO, para que os cristais de formazam fossem solubilidaos. As soluções foram transferidas para uma placa de 96 poços para a leitura da absorbância no espectrômetro a 550 nm.

A análise estatística foi executada através da análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Tukey, considerando $p<0,05$. E os resultados foram expressos graficamente por média + desvio padrão. O cálculo do CI_{50} foi determinado pela análise de Probit, método de Finney.

Resultados e Discussão

O método MTT mede a viabilidade celular através da redução do sal brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico em um produto insolúvel, cristal de *formazam*, que ocorre nas mitocôndrias pela ação de desidrogenases, em células

vivas. Solução de *formazam* possui absorbância máxima em 570 nm (Tonder, Joubert e Cromarty, 2015).

As Figuras 1 e 2 demonstram o comportamento das células da linhagem leucêmica K-562 frente ao tratamento com fração hexano e suas subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.

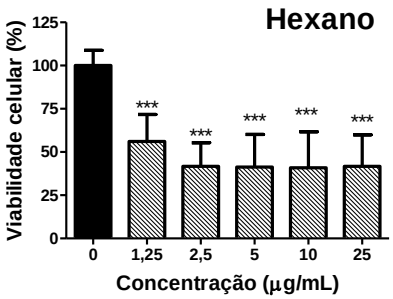


Figura 1 – Efeito da fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata* frente a células da linhagem K-562. Os resultados foram analisados por teste ANOVA e pós-teste de Tukey. O símbolo *** representa diferença estatística (p<0,001) em reação ao controle.

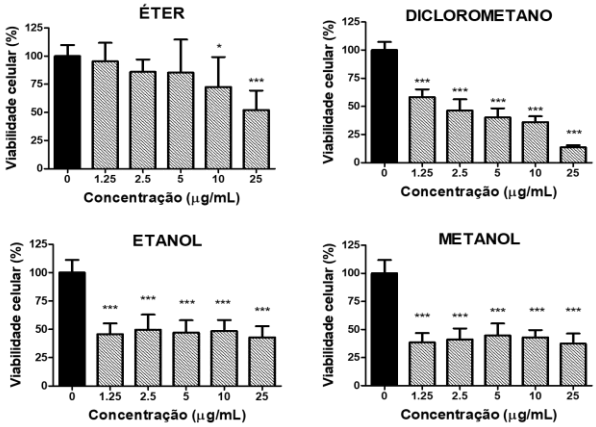


Figura 2 – Efeito das subfrações hexano do látex de *Euphorbia umbellata* frente a células da linhagem K-562. Os resultados foram analisados por teste ANOVA e pós-teste de Tukey. Os símbolos * e *** representam diferença estatística (p<0,05 e p<0,001, respectivamente).

Para uma possível comparação numérica das amostras é necessário calcular o CI_{50} (concentração inibitória para 50% das células). Com estes resultados, pode-se determinar a qual subfração a linhagem estudada é mais suscetível (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de CI_{50} das frações e subfrações do látex de *Euphorbia umbellata*.

Frações	**CI50 (µg/mL)**
Hexano	1,19±1,43
Subfrações	
Éter	>25 (30,61±7,70)
Diclorometano	2,35±0,47
Etanol	1,97±1,95
Metanol	8,14±8,28

Dados apresentados como valores de CI_{50} ± Erro padrão da média.

Observa-se que as frações mais eficazes são a hexano, diclorometano e etanol, por mostrarem menores valores de CI_{50}. Apesar do valor comparativamente alto, a subfração metanol ainda classifica-se, segundo o *American National Cancer Institute* (NCI) como promissora para o estudo citotóxico, uma vez que seu valor de

CI_{50} é inferior a 30 µg/mL (Suffness e Pezzuto, 1990). Os resultados favoráveis das frações diclorometano e etanol podem estar relacionados com a composição química do gênero *Euphorbia* que apresenta triterpenos comuns ao gênero, além, dos diterpenos do tipo forbol, descritos na literatura como as substancias com efeito citotóxico (Vasas e Hohmann, 2014).

Conclusões

A fração hexano e subfrações testadas apresentaram citotoxicidade sobre as células da linhagem leucêmica K-562, pois houve redução da viabilidade celular. Ressalta-se que, a exceção da subfração éter de petróleo, os valores de CI_{50} foram inferiores a 30 µg/mL, demonstrando o potencial citotóxico do látex de *Euphorbia umbellata.*

Agradecimentos

Agradeço ao professor Flávio 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 o teste de avaliação da citotoxicidade, e a minha co-orientadora a doutoranda Luiza S. Cruz que me acompanhou nos experimentos práticos durante a realização do meu estagio de iniciação cientifica. Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

CUNHA,L.C. et al. Acute and subacute toxicity studies os the látex and of the ethnolic extract of the leaves os *Synadenium umbellatum* Pax in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p.403-411,2009.

HOFFBRAND, A.V; MOSS.P.A.H. **Fundamentos em Hematologia**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer: Leucemia. Rio de Janeiro. 2017.

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

MOTA.M.F; BENFICA.P.L; VALADARES.M.C. *Synadenium umbellatum* Pax. Prometes cell cycle arrest and induces apoptosis in K-562 leukemia cells. **Brazil Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.3,2012.

OLIVEIRA JR., 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.sbpcnet.org.br/livro/57ra/programas/senior/RESUMOS/resumo_3372.html

SUFFNESS M, PEZZUTO JM: **Assays related to cancer drug discovery. In Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity.** Edited by Hostettmann K. London: 6 Academic Press; 1990:71–133.

TONDER, A.V; JOUBERT, A.M; CROMARTY, A.D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**. 2015.

VASAS, A.; HOHMANN, J. Euphorbia Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008-2012). **Chemical Reviews,** v. 114, n. 17, p. 8579-8612, 2014.