



Potencial antitumoral de extratos de *Eugenia involucrata* DC: uso de produtos regionais para tratar um problema mundial

Eduarda Laís Munari^{1*}; Julheli R. Girardelo¹; Gustavo Godinho Cechinel¹; Cristian Soldi¹; Greicy M.M. Conterato¹; Juan Claudio Benech²; Evelyn Winter¹.

¹UFSC, Curitiba-SC; ²Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

*munarieduarda0@gmail.com

RESUMO

Nos últimos anos, tem se buscado alternativas mais eficientes e menos tóxicas para a quimioterapia do câncer. Diante disso buscou-se avaliar a atividade antitumoral de extratos da polpa, semente e folha da espécie *Eugenia involucrata*, nativa do Sul do Brasil. Os extratos vegetais das sementes extraída à 50°C (S50) e folhas à 22°C (F22) induziram citotoxicidade em células tumorais PANC-1 demonstrando valores de CC_{50} iguais a 645 e 596 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, e seletividade para células cancerígenas. A partir da obtenção desses dados, o extrato das folhas passou por um processo de extração líquido-líquido utilizando o solvente hexano (EH), acetato de etila (EAE) e o produto aquoso (EAQ) para selecionar a subfração mais ativa. As frações EAE e EH apresentaram atividade e a fração EAE demonstrou melhor IS, pois não reduziu a viabilidade de células HUVEC até 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos com os extratos foram comparados com o quimioterápico gencitabina, padrão ouro no tratamento do câncer de pâncreas, e se mostraram mais interessantes. As alterações morfológicas características de apoptose foram evidenciadas nas células tratadas com os extratos S50 e F22. O potencial dos extratos em inibir a migração celular e alteração do citoesqueleto também foi avaliado e alguns extratos demonstraram efeito inibitório. Os dados preliminares levam a concluir que a espécie testada apresenta metabólitos de interesse e potencial biológico, o que permite a continuação do estudo em várias frentes de trabalho.

Palavras-chave: Produtos naturais; Câncer; Citotoxicidade; Cerejeira-do-mato

Realização:



Apoio:





1 INTRODUÇÃO

O câncer é o termo genérico utilizado para um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam uma característica em comum: o crescimento anormal de células, com tendência a invadir outros órgãos e tecidos do corpo. As neoplasias malignas são consideradas a segunda principal causa de morte em todo o mundo, sendo responsáveis por cerca de 8,8 milhões de óbitos em 2015, ficando atrás apenas das doenças que acometem o sistema cardiovascular (WHO, 2020). Grande parte da pesquisa atual em terapias contra o câncer busca desenvolver fármacos eficazes com o objetivo de combater células tumorais em crescimento, proliferação e metástase (KINGHORN; CHIN; SWANSON, 2009). No entanto, o progresso científico e tecnológico para a formulação de quimioterápicos potentes, por vezes apresentam-se ineficientes para o tratamento efetivo das neoplasias malignas. Baseado na necessidade de novos quimioterápicos, na importância regional da espécie *Eugenia involucrata* e na escassez de estudos com essa planta. Este projeto avaliará a propriedade antitumoral da polpa, folhas e sementes desta espécie com a finalidade de obter substâncias biologicamente ativas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo, Tratamento e Viabilidade Celular

As células PANC-1 (carcinoma pancreático humano), HUVEC (endotélio de veias do cordão umbilical humano) e VERO (epitélio renal de primatas) foram mantidas em garrafas para cultura celular, contendo meio DMEM F12 suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina, pH 7.4, mantidas em estufa umidificada a 37°C e com 5% de CO₂. As células foram submetidas a concentrações crescentes dos extratos brutos das sementes, polpas e folhas e posteriormente, subfrações do extrato bruto das folhas. Também avaliou-se o efeito do quimioterápico gencitabina. Para avaliar a viabilidade celular, as células foram submetidas ao ensaio de redução do reagente resazurina, após 72h de incubação com os tratamentos. Calculou-se valores de CC₅₀ para todos os extratos que induziram pelo menos 50% de citotoxicidade. O mesmo ocorreu para células de linhagem não tumoral HUVEC para que fosse possível calcular o Índice de Seletividade (IS) do extrato.

2.2 Migração Celular 2D

Realização:



Apoio:





Células foram plaqueadas e mantidas durante um período de 24 horas para aderência. Quando atingiram 70% da confluência, fez-se um risco em cada poço com o objetivo de causar uma divisão na monocamada. Fotomicrografias foram feitas nos tempos 0, 24 e 48 horas. Ao final do experimento, as imagens foram analisadas com o auxílio do software ImageJ.

2.3 Avaliação do tipo de Morte Celular e Citoesqueleto

Para a realização do ensaio de migração celular, as células PANC-1 foram submetidas aos tratamentos com a CC_{50} , coradas com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina e observadas em microscópio de fluorescência. Para avaliação dos filamentos de actina, as células PANC-1 foram marcadas com Phalloidin-iFluor 488 e avaliadas em microscópio confocal.

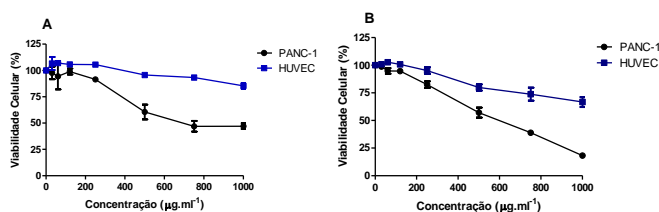
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Citotoxicidade dos extratos de *E. involucrata* DC

Os resultados demonstraram que o extrato bruto da polpa (P50) não induziu citotoxicidade. O extrato bruto da semente (S50) e da folha (F22) induziram maior efeito citotóxico em células PANC-1 sem causar toxicidade em células HUVEC. Logo, o IS demonstrou-se $\geq 1,5$ indicando predileção para as células tumorais.

Figura 1. Citotoxicidade do extrato S50 (A) e F22 (B) em células PANC-1 e HUVEC.

Tabela 1. Valores de CC_{50} e IS dos extratos brutos. O experimento foi realizado de forma independente pelo menos três vezes.



S50 – CC_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$	F22 – CC_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$
PANC-1 = 645	PANC-1 = 596
HUVEC > 1000	HUVEC > 1000
IS > 1,5	IS > 1,6

3.2 Citotoxicidade das subfrações do extrato bruto das folhas de *E. involucrata* e do quimioterápico Gencitabina

A fração aquosa (EAQ) não induziu citotoxicidade e as frações hidroalcoolicas (EH) e acetato de etila (EAE) induziram mais de 50% de citotoxicidade nas células tumorais (Figura 2A). Os valores das CC_{50} e o IS dos compostos ativos estão expressas na Tabela 2. Avaliou-se

Realização:



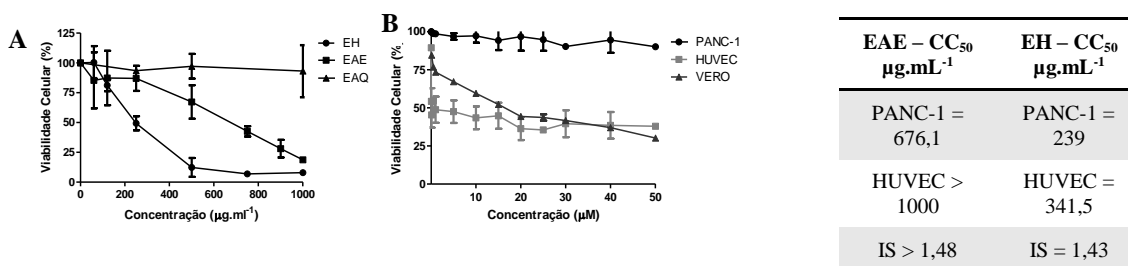
Apoio:





a toxicidade do quimioterápico Gencitabina e foi possível constatar que este fármaco foi mais citotóxico para células não tumorais HUVEC e VERO do que para a linhagem tumoral PANC-1 sobre a qual nenhuma toxicidade foi observada até a máxima concentração testada de 50 μM (Figura 2B).

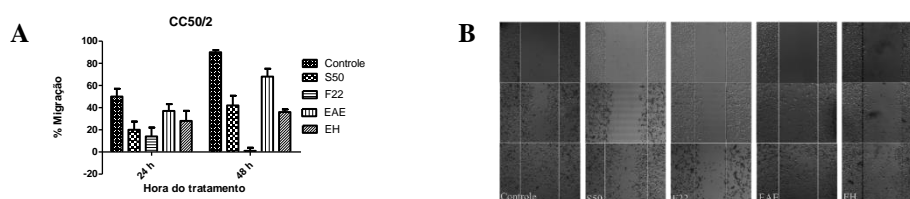
Figura 2 – A) Citotoxicidade das subfrações do extrato bruto das folhas de cerejeira em PANC-1. B) Citotoxicidade da Gencitabina. Tabela 2. Valores de CC_{50} e IS com as frações EAE e EH. O experimento foi realizado de forma independente pelo menos três vezes.



3.4 Migração Celular 2D

O ensaio demonstrou que os extratos F22 e S50 e a subfração EH foram capazes de inibir a capacidade de migração das células tumorais PANC-1 (Figura 4).

Figura 4. Ensaio de migração celular realizado após 24 e 48h de incubação com os extratos. A) O experimento foi realizado de forma independente pelo menos três vezes. B) Imagens representativas de 1 experimento. Aumento de 40x.



3.5 Avaliação do tipo de Morte Celular e Citoesqueleto

A Figura 5A demonstra que os extratos S50 e F22 induziram majoritariamente a apoptose caracterizada por fragmentação do DNA, no entanto observou-se também a presença de necrose caracterizada por a ruptura da membrana celular. O extrato S50 também induziu alterações no citoesqueleto celular evidenciado pela marcação dos filamentos de actina (Figura 5B)

Realização:

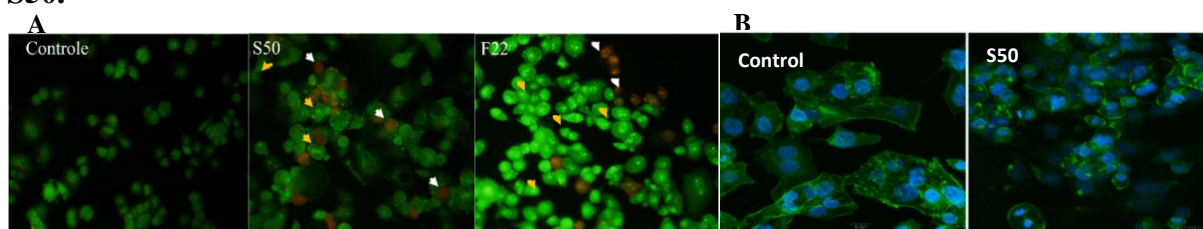


Apoio:





Figura 5. A) Morte celular induzida pelos extratos vegetais na linhagem celular PANC-1. Setas brancas indicam necrose e setas amarelas indicam apoptose. Imagens representativas de um experimento, 400x. **B) Avaliação dos filamentos de actina após tratamento com extrato S50.**



4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que os extratos F22 e S50 da espécie *E. involucrata*, bem como as subfrações EH e EAE apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais, podendo estar relacionada a presença de compostos fenólicos extraídos. O principal tipo de morte celular induzida foi a apoptose e como mecanismo de ação sugerimos que o extrato S50 pode estar atuando na desorganização do citoesqueleto celular. A inibição da migração celular pode sugerir que os extratos ativos possuem atividade antimetastática. Outros estudos com o extrato S50 indicaram que o mesmo atua induzindo estresse oxidativo (dados não mostrados). Desta forma, o presente estudo colaborou para a ampliação dos conhecimentos e geração de mais informações a respeito da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos brutos e frações da espécie *E. involucrata*. Estes dados foram recentemente publicados e demonstraram ter potencial promissor para novos estudos e possível aplicação como antitumoral.

REFERÊNCIAS

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M. Discovery of Natural Product Anticancer Agents from Biodiverse Organisms. **Curr Opin Drug Discov Devel**. Chicago, p. 189-196. mar. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 27 out. 2020.

Apoio financeiro: FAPESC, CNPQ. **Agradecimentos:** UFSC, LAFRA.

Realização:



Apoio:

