

ANÁLISE DO EFEITO ANTITUMORAL DO EXTRATO DA CASCA DO FRUTO DE CARYOCAR BRASILIENSE CAMB. EM LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA

Autores: JOÃO VITOR DA SILVA RODRIGUES, JÉSSICA NAYARA BASILIO SILVA, AMANDA RODRIGUES SANTOS, VICTOR HUGO DANTAS GUIMARÃES, LUDMILLA REGINA DE SOUZA DAVID, GERALDO ACLECIO MELO, ALFREDO MAURICIO BATISTA DE PAULA

Introdução

O câncer é uma síndrome designada a doenças que tem em comum um crescimento anormal de células, caracterizada pela perda do controle da divisão celular e pela capacidade de invadir órgãos e tecidos distantes (INCA, 2011). Dentre os tipos de câncer, destaca-se o câncer de pele, que pode ser de dois tipos: melanoma e não melanoma. O melanoma cutâneo originado nos melanócitos é o de menor incidência, porém o mais letal, culminando em esforços na busca por fármacos antitumorais eficazes no controle dessa doença (POPIM *et al.*, 2008). Nesse sentido os produtos naturais têm desempenhado um papel importante na descoberta de drogas antitumorais (DA MOTA *et al.*, 2012). Os compostos químicos presentes nas plantas medicinais têm apresentado historicamente uma grande importância no ramo da oncologia. Alguns estudos têm demonstrado o potencial anti-inflamatório e antioxidante de extratos de *Caryocar brasiliense* Camb (SOUZA *et al.*, 2011; GALI MUHTASIB *et al.*, 2015). No entanto, são escassos os estudos que demonstram a atividade antineoplásica de extratos dessa planta. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito antitumoral da fração butanólica do extrato da casca do fruto do *Caryocar brasiliense* Camb. sobre células de melanoma murino em estudos *in vitro*.

Material e métodos

A. Obtenção dos frutos do *Caryocar brasiliense* Camb.

Frutos do pequi foram adquiridos no mercado da cidade de Montes Claros-MG e foram selecionados aqueles com epicarpo saudável. Logo após foram encaminhados para o laboratório de fisiologia e bioquímica de plantas da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), onde foram cortados, secos em estufa a temperatura de 45°C, triturados até obtenção de pó fino, e acondicionados apropriadamente até o seu uso.

B. Obtenção do extrato

O material anteriormente triturado foi misturado ao metanol 80% como solvente de extração, na proporção de 50 g de material para 300 mL de solvente. Após 24 horas de agitação periódica, a mistura foi filtrada e colocada em estufa de ar circulante a 45°C para redução do volume. Adicionou-se água destilada ao extrato hidroetanólico para procedimento de fracionamento líquido-líquido, na proporção de 50 mL de água para 100 mL de extrato. Logo após o fracionamento foi realizado utilizando-se butanol. Posteriormente esse material foi encaminhado para o laboratório de pesquisa em saúde do Hospital Universitário Clemente de Faria, onde foi preparado para testes *in vitro*.

C. Cultura e contagem celular

Foram utilizadas células de melanoma metastático murino da linhagem B16F10. Para seu cultivo foi utilizado meio RPMI (Rosweel Park Memorial Institute Medium), suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico. As células foram mantidas em garrafas para cultura de tecido em estufa a 37° e atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e observadas diariamente. Quando atingida a confluência, as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer.

D. Preparo do extrato e tratamentos

Para o preparo dos extratos, pesou-se 50 mg da fração butanólica e adicionou-se 5 mL de PBS (Tampão fosfato salino) e a mistura foi agitada e filtrada. As células B16F10 foram semeadas em microplicas de poliestireno por 24 horas e submetidas aos tratamentos com as diferentes concentrações do extrato (1000, 500, 250 e 125 µg/mL) por 24 e 48 horas. Células tratadas com meio de cultivo e PBS foram utilizadas como controle.

E. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). A absorbância foi usada como um índice de viabilidade celular e os resultados expressos como porcentagens relativas ao grupo controle tratado com PBS. Para maior confiabilidade, os ensaios foram realizados em triplicata e foram conduzidos três experimentos independentes.

F. Avaliação da atividade migratória

As células da linhagem B16F10 foram plaqueadas em uma placa de 6 poços. Após atingirem uma confluência de 80%, foram submetidas a uma fissura feita com a ponta de uma micropipeta de 200 µL estéril. Logo após foram fotografados e submetidos aos tratamentos com o extrato do pequi nas concentrações de 250 µg/mL e 500 µg/mL e PBS por 24 e 48 horas. Posteriormente o extrato foi retirado e adicionado 200 µL de meio RPMI e imagens obtidas em microscópio invertido IX81 (Olympus) em aumento de dez vezes utilizando-se a câmera SC30 (Olympus, Center Valley, Pennsylvania, EUA). O software ImageJ® foi utilizado para mensurar a área da fenda antes e depois do tratamento. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

G. Análises estatísticas



A análise estatística dos dados foi realizada no software GraphPad Prisma (versão 5.0®, San Diego, Califórnia, USA), com 95% de confiabilidade ($p < 0,05$). Para o teste de viabilidade celular foi realizado o ANOVA *two-way*, e para os demais ensaios ANOVA *one-way*, seguido pelo pós-teste Bonferroni.

Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que o extrato da casca do *Caryocar brasiliense* Camb. reduz a viabilidade celular nas concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas e nas concentrações de 125 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em 48 horas (Fig. 1). Além disso, inibição da atividade migratória de células B16F10 foi observada nos tempos de 24 e 48 horas, registrando-se um aumento desses efeitos com o aumento da concentração e do tempo de tratamento com o extrato, pode-se perceber que as células tratadas na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram menor atividade migratória quando comparada ao grupo controle (PBS) e após 48 horas de tratamento com a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, não houve migração de células para a área riscada, assim como houve um aumento da área. As células tratadas na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ nos períodos de 24 e 48 horas apresentaram além da redução da atividade migratória, um aumento da área riscada (Fig. 2). A redução da viabilidade celular é um indicativo inicial da atividade antineoplásica presente na maioria dos quimioterápicos e agentes antitumorais usados clinicamente (AJITH e JANARDHANAN, 2003). Esses dados corroboram com o estudo de Martins (2016), que encontrou atividade antiproliferativa da casca do fruto do pequi em células de linhagem de carcinoma de língua SCC-9, com mortalidade celular total na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$. A migração celular está relacionada à formação, manutenção e regeneração do tecido, bem como as condições patológicas, como a invasão do câncer, tendo em vista que o melanoma é um câncer agressivo, com alto potencial de metástase e baixa eficácia de terapêutica convencional (WOZNIAK, 2005).

Considerações finais

Este estudo mostrou pela primeira vez que a fração butanólica da casca do *C. brasiliense* Camb. possui um efeito contra células de melanoma metastático, diminuindo a viabilidade celular e a capacidade de migração. Entretanto os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos ainda não foram elucidados, havendo a necessidade de estudos específicos. O resultado obtido apresenta características promissoras, visto que as atuais intervenções clínicas apresentam limitações para tratar o melanoma.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio. Agradecemos também a toda equipe de Pesquisa em Saúde do Hospital Universitário pelo apoio.

Referências

- AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *Journal of ethnopharmacology*, v. 84, n. 2, p. 157-162, 2003.
- DA MOTA, M. F. et al. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. *Journal of ethnopharmacology*, v. 139, n. 2, p. 319-329, 2012.
- GALI MUHTASIB, H. et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis*, v. 20, n. 12, p. 1531-1562, 2015.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Ministério da Saúde. (2011). ABC do Câncer no Brasil. **Abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro. Estimativa 2014. Rio de Janeiro.
- MARTINS, I. O. M. **Atividade antineoplásica de princípios ativos obtidos a partir do extrato da casca do fruto do pequi (Caryocar brasiliense camb.)**. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Montes Claros. Montes Claros-MG, 2016.
- POPIM, R. C. et al. Câncer de pele: uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu. *Ciência & Saúde Coletiva*, p. 1331-1336, 2008.
- SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Editora UFOP, 2011.
- WOZNIAK, M. A. et al. R-Ras controls membrane protrusion and cell migration through the spatial regulation of Rac and Rho. *Molecular biology of the cell*, v. 16, n. 1, p. 84-96, 2005.

Figura 1. Viabilidade celular de B16F10 expostas a diferentes concentrações da fração butanólica de *C. brasiliense* Camb. (A) 24 horas. (B) 48 horas.



Figura 2. Migração celular de B16F10 após o tratamento com a fração butanólica de *C. brasiliense* Camb., em duas diferentes concentrações e PBS, antes e após tratamento. (A) 24 horas. (B) e 48 horas.