

# Propriedades biológicas do extrato bruto de *E. Uniflora* L em células humanas de câncer cervical

<sup>1</sup> GABRIEL FERNANDES SILVEIRA, <sup>1</sup>ALLAN PEREIRA <sup>1</sup>FELIPE BÁGGIO, <sup>3</sup>FRANCINE DOS SANTOS RAMOS, <sup>2</sup> ALINE BECKENKAMP, <sup>2</sup> ANDREIA BUFFON, <sup>1</sup>ALESSANDRA NEJAR BRUNO

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus POA (IFRS-POA). <sup>2</sup> Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do RS (UFRGS). <sup>3</sup>Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

## INTRODUÇÃO

- O câncer de colo uterino humano ou câncer cervical (SiHa) ocupa um lugar de destaque nas taxas de morbimortalidade entre a população feminina, sendo a segunda neoplasia mais frequente no mundo;
- Os tratamentos atualmente disponíveis apresentam eficácia variável, além de possibilidade de recorrência da doença, altos custos e uma série de efeitos colaterais;
- Estudos vêm demonstrando propriedades terapêuticas de diferentes espécies vegetais, relacionando tais propriedades com a expressão de moléculas ativas;
- Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), a pitangueira, é uma planta nativa brasileira empregada na medicina popular e que possui efeitos biológicos já descritos na literatura, tais como: antiinflamatório (SCHAPOVAL et al., 1994), atividade contrátil (GBOLADE; ILESANMI; ALADESNI, 1996), antioxidante (LIMA; MELO; SILVA, 2002), antimicrobiano (SIQUI et al., 2000), hipotensivo (CONSOLINI; SARUBBIO, 2002) e hipoglicemiante (LEE et al., 2000).
- Até o momento, não existem estudos relacionando os efeitos biológicos de plantas da espécie *uniflora* com proliferação e/ou toxicidade em células tumorais.

## OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações do extrato bruto aquoso de *E. uniflora* L. em parâmetros como viabilidade, adesão e migração celular e mecanismos de morte celular em uma linhagem de células de câncer uterino humano (SiHa) e em células não tumorais (linfócitos humanos);
- Contribuir para a busca de novos fármacos antineoplásicos para este tipo de tumor.

## METODOLOGIA

**Cultura de células:** Células SiHa e linfócitos humanos foram cultivados, respectivamente, em meios de cultura DMEM e RPMI-1640, ambos suplementados com antimicrobianos e 10% de soro fetal bovino (FBS), e mantidos em incubadora a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

**Extrato bruto aquoso:** Folhas de *E. uniflora* L. foram coletadas, desinfestadas, secas em estufa, a 60°C, por quatro dias e trituradas. O triturado dessas folhas foi misturado ao meio de cultura DMEM (não suplementado), e a mistura obtida foi filtrada usando membranas com poros de 0,22 µm de diâmetro.

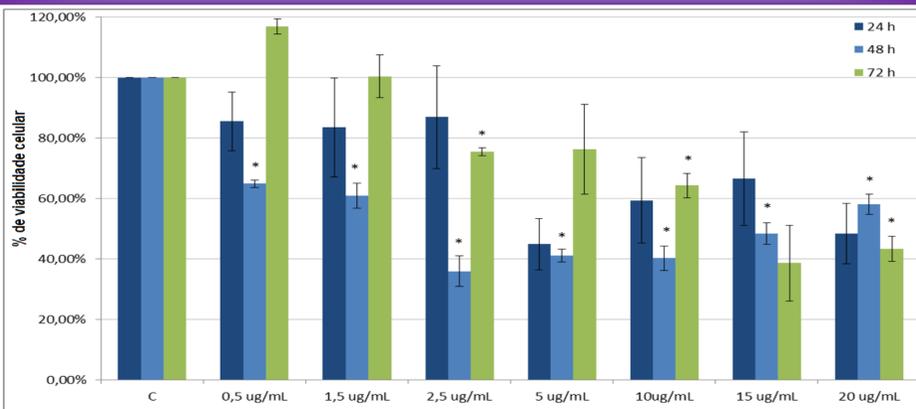
**Ensaio de viabilidade celular** (FIG. 1 e 2): Células SiHa (2.800 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços. Após subconfluência, parte das células recebeu o tratamento com o extrato bruto aquoso nas concentrações de 1,5 a 20 µg/mL, e a outra parte foi tratada com meio DMEM (controle), ambas por 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células foram submetidas ao ensaio de MTT (5 mg/mL). Os resultados foram expressos com uma porcentagem em relação ao controle para a obtenção da concentração inibitória (IC50). Células de linfócitos humanos foram plaqueadas (15.000 células/poço) em placas de 24 poços, e tratadas, com 1,5 a 20 µg/mL de extrato aquoso bruto, por 24 horas. As células foram contadas utilizando corante azul de tripan e hemocitômetro.

**Migração celular** (FIG. 3 e 4): Células SiHa (28.000 células/poço) foram semeadas em placa de 24 poços até a confluência total. Posteriormente, o meio de cultura dos poços foi descartado, uma ferida foi feita na monocamada celular e os poços foram lavados com solução tampão PBS para aplicação do tratamento com o extrato no IC50 (7,8 µg/mL), durante 24 e 48 horas. Fotografias das células foram obtidas antes e depois da aplicação do tratamento, através do software Toupview.

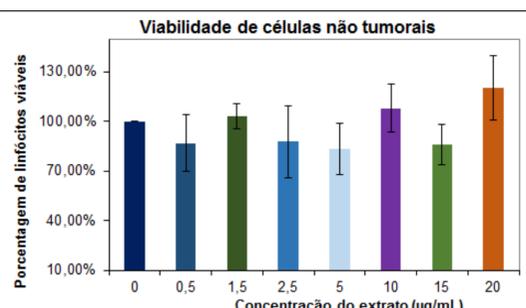
**Adesão celular** (FIG. 5): Células SiHa foram plaqueadas (28.000 células/poço) em placas de 24 poços e tratadas com o extrato nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL, por 24 e 48 horas. De cada poço, foi retirada uma alíquota de suspensão celular, que foi misturada, em igual proporção, ao corante azul de tripan para a contagem celular em hemocitômetro.

**Análise de Apoptose/Necrose** (FIG. 6): Células SiHa foram semeadas (100.000 células/poço) em placas de 6 poços e cultivadas até confluência. Aplicou-se tratamento com o IC50 (7,8 µg/mL) durante 24 e 48 horas. As células, então, foram marcadas usando o kit "Anexina V/iodeto de propídio" (anexina V-FITC apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences) e analisadas em citômetro de fluxo.

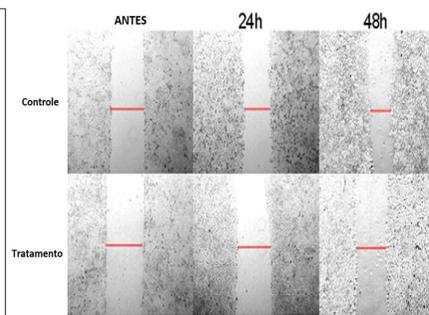
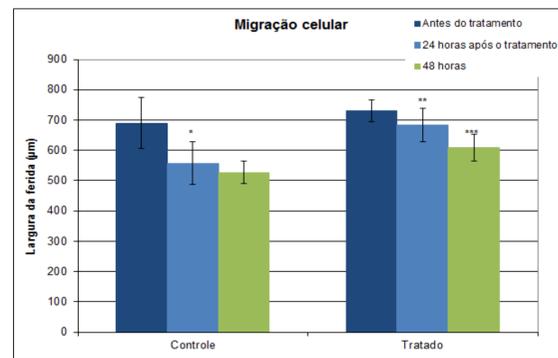
## RESULTADOS



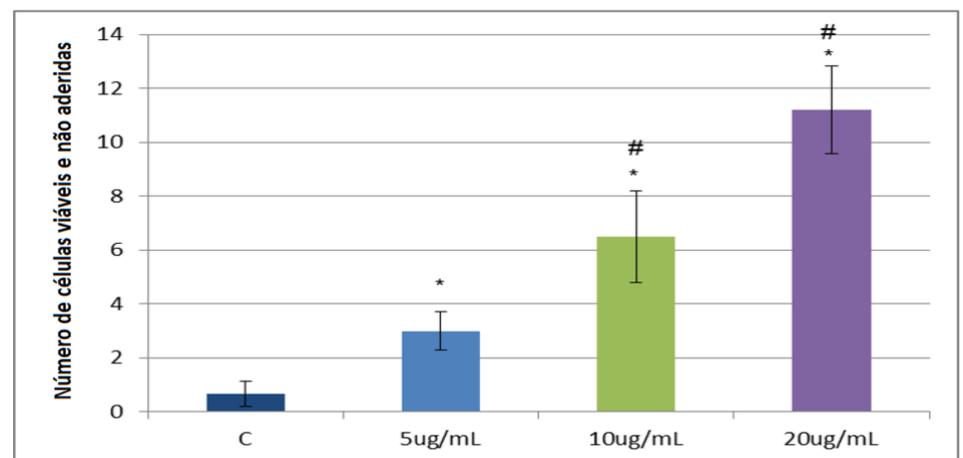
**FIGURA 1 - Ensaio MTT:** Efeito de diferentes concentrações do extrato de *E. uniflora* L. na viabilidade de células de carcinoma cervical (SiHa) após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Os dados mostram a média e o desvio-padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. \* P < 0,05 (ANOVA de 1-via, seguida pelo teste de Tukey).



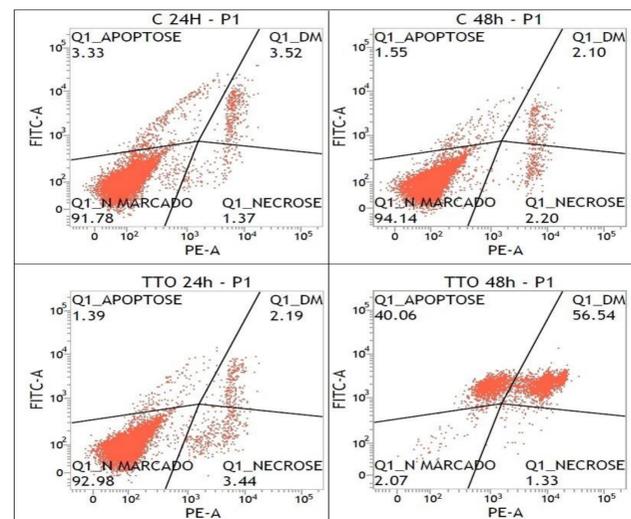
**FIGURA 2 - Ensaio de viabilidade de linfócitos:** Efeito de diferentes concentrações do extrato de *E. uniflora* sobre a viabilidade de linfócitos humanos após 24 horas de tratamento. Dados mostram a média e o desvio-padrão de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Não há resultados significativos sobre a viabilidade das células.



**FIGURAS 3 e 4 - Ensaio de Migração (cura da ferida):** Efeito do IC50 do extrato de *E. uniflora* L. sobre a capacidade de migração de células SiHa após 24 e 48 horas de tratamento. Os dados mostram a média e o desvio-padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. \* P < 0,022, diferente do controle antes do tratamento. \*\* P < 0,012, diferente do controle antes de 24h. \*\*\* P < 0,010, diferente do controle após 48h (ANOVA de 1-via, seguida pelo teste de Tukey).



**FIGURA 5 - Análise de adesão celular:** Efeito de diferentes concentrações do extrato de *E. uniflora* L. sobre a capacidade de adesão das células SiHa, após 24 horas de tratamento. Os dados mostram as médias e o desvio-padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. \* P < 0,05, diferente do controle. # P < 0,05, diferente do 5µg/mL, diferente (ANOVA de 1-via, seguido pelo teste de Tukey).



**FIGURA 6 - Análise de apoptose/necrose:** Efeito do IC50 do extrato de *E. uniflora* L. no índice de mortalidade de células SiHa, após 24 e 48 horas de tratamento, e análise de morte celular através do kit Anexina V/iodeto de propídio e citômetro de fluxo.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

- As diferentes concentrações de *E. uniflora* inibiram significativamente a viabilidade das células de câncer cervical em 24 horas (13 a 57%), 48 horas (35 a 67%) e em 72 horas de tratamento (24 a 65%);
- Não foi verificada inibição significativa das células não tumorais (linfócitos humanos);
- As diferentes concentrações do extrato testadas reduziram significativamente a capacidade de adesão das células tumorais;
- Por citometria de fluxo, verificou-se, principalmente, uma morte celular mediada por apoptose (1,39% após 24 horas e 40,06% após 48 horas de tratamento)
- Estes resultados demonstram que o extrato bruto aquoso de *E. uniflora* L. foi capaz de influenciar em parâmetros relevantes para o desenvolvimento e manutenção de células tumorais, e enfatizar a importância de estudos que utilizam plantas nativas para a geração de novas abordagens para o câncer do colo do útero humano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; STASI, L. C. D.; JUNIOR, A. F. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.
- OLIVEIRA, A. C. P.; ENDRINGER, D. C.; AMORIN, L. A. S.; BRANDÃO, M. G.; COELHO, M. M. Effect of the extracts & fractions of *Baccharis trimera* & *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic & non-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 465-469, 2005.

## APOIO