

Potencial antitumoral das cascas do caule de *Bumelia sartorum*

Antitumor potential of
Bumelia sartorum stem barks

HALLINY SIQUEIRA RUELA

Primeiro-Tenente (S) - Farmacêutica do Laboratório Farmacêutico da Marinha.
Doutorado em Biotecnologia Vegetal.

IVANA CORREA RAMOS LEAL

Farmacêutica da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
Doutorado em Química de Produtos Naturais.

RICARDO MACHADO KÜSTER

Farmacêutico do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
Doutorado em Química de Produtos Naturais.

Resumo: Na medicina tradicional, o chá das cascas do caule de *Bumelia sartorum* é utilizado para combater diversas doenças, incluindo câncer. O presente trabalho estuda evidências científicas da atividade antitumoral atribuída popularmente a esta espécie, buscando uma proposta do mecanismo de ação envolvido, além da investigação do efeito sobre células normais. Métodos: O potencial anticâncer foi avaliado contra diferentes linhagens de células tumorais humanas: A549, K562, Jurkat, MCF7 and PC3. Também foi verificado o efeito tóxico sobre linfócitos murinos normais. Resultados: Os padrões de ácidos palmítico e linoleico, majoritários na partição DCM, e também a partição AcOEt e a fração F5 mostraram alto efeito inibitório sobre a viabilidade das linhagens tumorais, sendo mais ativos contra células do tipo Jurkat. A ação antileucêmica dessas amostras parece estar relacionada à indução da apoptose. Adicionalmente, a maior parte das amostras derivadas de *B. sartorum*, em altas concentrações, mostrou baixa toxidez para linfócitos normais. Conclusão: A atividade encontrada mostra que a abordagem etnofarmacológica na escolha de plantas para estudos pode ser útil, e os resultados indicam que a espécie pode ser considerada como uma potencial alternativa para a pesquisa de novos fármacos para o tratamento de câncer, em especial para leucemia aguda de células T.

Palavras-chave: Ensaios de seleção de medicamentos antitumorais. *Bumelia sartorum*. Ácidos graxos. Compostos fenólicos.

Como citar este artigo: Ruela HS, Leal ICR, Küster RM. Potencial antitumoral das cascas do caule de *Bumelia sartorum*. Arq Bras Med Naval. 2017 jan/dez;78(1): 49-54.

Submetido: 01 de agosto de 2017

Revisado e aceito: 15 de setembro de 2017

Endereço de contato: Rua: César Zama, 185 - Bairro: Lins de Vasconcelos, Rio de Janeiro - RJ, CEP:20725-090

E-mail: hnmd.abmn@marinha.mil.br

Os autores não relatam interesse comercial, financeiro ou de propriedade nos produtos ou empresas descritos neste artigo. As opiniões expressas neste artigo são de responsabilidade exclusiva dos autores.

Antitumor potential of *Bumelia sartorum* stem barks

INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células e está associado à ocorrência de alterações que se acumulam progressivamente no material genético de uma célula normal. Apesar das diversas campanhas de estímulo ao combate dos fatores de risco do câncer, o contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo.¹

A resistência à quimioterapia é um grande obstáculo no tratamento de pacientes com câncer. Estudos mostram que aproximadamente 70% dos pacientes são intrinsecamente resistentes ou desenvolvem resistência aos medicamentos antineoplásicos. Esse fenômeno de resistência a múltiplas drogas é multifatorial, podendo ser conferido por uma variedade de mecanismos celulares, tais como defeitos na regulação de genes controlando a apoptose ou aumento dos mecanismos de desintoxicação intracelular.² Dessa forma, a busca por novas terapias se faz necessária, sendo a fitoterapia uma alternativa a ser considerada.

Bumelia sartorum Mart. (sinonímia: *Bumelia sertorum*) é uma planta nativa, conhecida popularmente por quixaba, quixabeira ou rompe-gibão, cuja localização se estende, esporadicamente, desde o Norte de Minas Gerais até o Piauí.³ Com relação à composição química, a literatura descreve a abundante presença de substâncias polifenólicas, como catequina e epicatequina e procianidinas do tipo B.⁴

Na medicina tradicional, as cascas do caule são usadas como chá em preparações para combater diversas doenças, como diabetes⁵, infecções bacterianas⁶ e processos inflamatórios.⁷ De acordo com o conhecimento popular, a quixabeira também é utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer. Entretanto, nenhum estudo científico abordando essa aplicação terapêutica foi encontrado.

O presente estudo busca evidências

científicas da atividade antitumoral atribuída popularmente à espécie *B. sartorum*, por meio da avaliação do potencial antitumoral in vitro e proposta do mecanismo de ação envolvido. Adicionalmente, foi verificado in vitro o efeito tóxico de *B. sartorum* sobre células normais.

METODOLOGIA

Amostras Vegetais e Padrões

Neste trabalho foram utilizadas partições derivadas do extrato bruto metanólico das cascas do caule de *B. sartorum*, preparadas em solventes orgânicos de polaridade crescente, conforme previamente descrito por Ruela⁴: hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH). Também foram utilizados o extrato aquoso das cascas (AQUO), preparado de acordo com o conhecimento popular⁶, a fração F5, derivada da partição AcOEt e rica em substâncias fenólicas, especialmente procianidinas do tipo B⁵, e ainda os padrões dos ácidos graxos linoleico, oleico e palmítico, majoritários na partição DCM.⁶

As amostras vegetais e os padrões de ácidos linoleico e oleico foram incubados com as células tumorais nas concentrações finais de 50, 100, 150, 200 e 250 µg/ml. A fração F5 foi testada em 10, 25, 40, 50 e 100 µg/ml, e o padrão de ácido palmítico em 1, 10, 25, 40 e 50 µg/ml. Para a incubação com linfócitos normais foram utilizadas as duas maiores concentrações testadas para as linhagens tumorais, no intuito de determinar a toxicidade das amostras sobre células normais.

Cultivo das Linhagens Tumorais

O potencial antineoplásico da espécie foi avaliado estudando as seguintes linhagens tumorais humanas: A549 (câncer de pulmão), K562 (leucemia mielóide crônica), Jurkat (leucemia aguda de células T), MCF7 (câncer de mama) e PC3 (câncer de próstata). As células são mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido e, após descongelamento, as mesmas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma

Chemicals®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida de 5% de Co₂.

Isolamento dos Linfócitos Normais Murinos

O isolamento das células foi realizado a partir do baço de camundongos da linhagem Swiss Webster (SW), de aproximadamente 25 g, de acordo com Pinto e colaboradores.⁸ O baço foi retirado do animal assepticamente e triturado em 5 ml de meio RPMI diluído em PBS (1:1). Em seguida, foram adicionados 10 ml de solução de ACK (cloreto de amônio 145 mM, bicarbonato de potássio 10 mM e ácido etilenodiaminotetracético 2 mM). Após homogeneização, centrifugação e lavagens, o material resultante foi ressuspenso no meio para a contagem das células. O trabalho teve aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob registro IMPPG 014.

Avaliação da Proliferação Celular

Os ensaios para avaliação da proliferação celular, tanto com linhagens tumorais humanas quanto com linfócitos normais murinos foram realizados pelo método colorimétrico com MTT (3-[(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]; Sigma®).⁹

Inicialmente, as células tumorais (5 x 10⁴ células/ml) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas overnight. Após, foram tratadas com diferentes concentrações de amostras ou meio de cultura (controle) durante 48h. Similarmente, linfócitos normais murinos (2 x 10⁶ células/ml) foram semeados na presença de concanavalina A 10 µg/ml. Após incubação das células com ou sem as amostras por 48 h, 20 µl de MTT (5 mg/ml em solução NaCl 0,9% tamponada, pH 7,4) foram adicionados a cada poço. Após 4 h de incubação, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e os cristais formados dissolvidos em DMSO (200 µl/poço). A leitura das absorvâncias foi feita em 570 nm.

Para verificar o efeito sobre as linhagens tumorais humanas, a citotoxicidade/viabilidade

Antitumor potential of
Bumelia sartorum stem barks

celular foi calculada considerando os valores obtidos no controle como 100%, descontados os valores dos brancos, e os resultados expressos em valores de CI_{50} , que corresponde à concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular em comparação ao controle. Para os linfócitos murinas normais, foram testadas duas das maiores concentrações utilizadas para as linhagens de câncer, para verificar a citotoxicidade de tais concentrações sobre células normais.

Avaliação do Efeito sobre Ciclo Celular da Leucemia Linfocítica Jurkat

Essa análise foi realizada de acordo com a metodologia de Dalmau e colaboradores¹⁰ a fim de buscar um possível mecanismo de ação antitumoral desta espécie. De acordo com resultados prévios do teste com MTT, foram estudadas nesse ensaio as frações AcOEt (60 µg/ml) e F5 (50 µg/ml) e os padrões de ácidos palmítico (50 µg/ml) e linoleico (70 µg/ml), além de um ponto controle positivo de inibição do ciclo com metotrexato (MTX) a 10 µg/ml. As concentrações testadas equivalem a valores entre a CI_{50} e a CI_{100} de cada amostra. As culturas foram preparadas em garrafas contendo 30 ml de suspensão celular (5×10^4 células/ml) e 6 ml de cada amostra vegetal nas devidas concentrações. No controle foram utilizados 6 ml de meio de cultura. Após 48 h a 37°C e 5% de CO_2 , o volume de solução celular equivalente a 1×10^5 células foi separado, centrifugado e ressuscitado em 500 µl de iodeto de propídio (PI – Sigma Chemical®) 50 µg/ml (diluído em tampão citrato + triton 0,3%). Após incubação de 15 minutos, na ausência de luz, foram adicionados 500 µl de RNase 100 µg/ml (Sigma Chemical® - solução preparada em tampão citrato 43 mM, pH=8,2). A leitura dos dados foi realizada no citômetro de fluxo (Thermo Fisher Scientific®, modelo Nano Drop). A fluorescência do PI foi analisada no canal FL-2 (585 ± 15 nm). A aquisição das células foi feita com o programa Cellquest-Pro e a análise dos histogramas feita com o programa WinMDI 2.8. Os resultados estão

expressos em número relativo (porcentagem relativa) e absoluto (número total) de células em cada fase do ciclo celular.

Avaliação do Efeito sobre a Apoptose da Leucemia Linfocítica Jurkat

Seguindo o protocolo descrito pela BD Pharmingen®, a suspensão de células foi centrifugada, lavada com PBS, ressuscitada em 200 µl de tampão de ligação (10 mM HEPES; NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM $CaCl_2$ – estocado a 4°C) e homogeneizada. Em seguida, 100 µl (1×10^5 células) foram transferidos para o tubo de citometria, ao qual foram adicionados 2,5 µl de anexina V-FITC (Kit BD Pharmingen®) e 1 µl de PI 100 µg/ml. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, 400 µl de tampão de ligação foram adicionados e as leituras foram feitas em citômetro de fluxo.

Análise Estatística

Os testes *in vitro* foram realizados em triplicata e os resultados representam a média ± desvio padrão de três ensaios independentes. A comparação entre os dados foi feita utilizando o software GraphPad Prism®, através dos testes t de Student ou ANOVA seguido de Tukey, considerando a diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca de evidências científicas que suportem o uso popular da espécie *B. sartorum* como agente antitumoral foi realizada inicialmente através da determinação da viabilidade celular, pelo ensaio do MTT, em linhagens humanas de diferentes tipos de câncer de grande prevalência no Brasil e no mundo.

A fim de facilitar a comparação da atividade para as diferentes linhagens testadas, foram calculados os valores de CI_{50} para cada uma das amostras ativas (Tabela 1). Os menores valores foram observados para a linhagem Jurkat, nas frações AcOEt e F5 (37,2 e 23 µg/ml, respectivamente) e nos ácidos linoléico e palmítico (21,8 e 23,2 µg/ml, respectivamente). Por esse motivo, essas

amostras foram analisadas por citometria de fluxo para verificar se provocam interferência no ciclo celular ou no processo de apoptose da linhagem.

Dando continuidade ao estudo da ação antitumoral da espécie *B. sartorum*, avaliou-se o efeito das frações (com maior atividade inibidora da viabilidade celular) sobre o ciclo celular da linhagem leucêmica linfocítica Jurkat, que se mostrou a mais sensível às amostras. A análise deste ensaio é feita pela distribuição dos núcleos de um experimento representativo em função da intensidade de fluorescência do PI, proporcional ao conteúdo de DNA, indicando os percentuais dos mesmos em cada fase do ciclo celular: núcleos que possuem menor quantidade de DNA (menor fluorescência) correspondem à fase G0/G1; a região intermediária representa os núcleos na fase S; enquanto núcleos que incorporaram duas vezes mais PI em relação a G0/G1, possuem o DNA já duplicado, correspondendo à fase G2/M.¹⁰

A análise do efeito das amostras nas médias dos números relativo e absoluto de núcleos de células Jurkat, mostrando cada fase do ciclo celular é visualizada na Figura 1. Esses números não foram alterados significativamente pelos tratamentos com a fração AcOEt e o ácido linoleico. A fração F5 promoveu um leve aumento no percentual relativo de células na fase G0/G1, em comparação ao controle. O ácido palmítico induziu uma redução no número relativo de células na fase G2/M ($p < 0,01$). Em relação ao número absoluto, este ácido graxo promoveu redução em todas as fases do ciclo celular, quando comparado ao controle, assim como o tratamento com MTX. Resultados semelhantes têm sido descritos para extratos de outras espécies ricos em substâncias fenólicas¹¹ e para o ácido palmítico¹², utilizando esta e outras células tumorais.

Como a morte celular é um dos destinos das células que têm o ciclo celular inibido, neste trabalho avaliamos os efeitos das amostras mais ativas sobre a apoptose de células Jurkat. A indução de morte por apoptose foi sugerida pela exteriorização de

Antitumor potential of
Bumelia sartorum stem barks

TABELA - 1

Valores de CI50 ($\mu\text{g/ml}$) das amostras derivadas de *B. sartorum* e padrões de ácidos graxos majoritários na fração vegetal obtida em diclorometano (linoléico, oléico e palmítico) sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens tumorais. A CI50 corresponde à concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular em comparação ao controle. AQUO: extrato aquoso; MeOH: extrato metanólico; DCM: fração em diclorometano; AcOEt: fração em Acetato de Etila; F5: subfração derivada da AcOEt; BuOH: fração butanólica.

Amostras	Jurkat	K562	A549	MCF7	Pc3
Extrato AQUO	151,4	-	-	138	250
Extrato MeOH	52,5	128,8	182	77,6	83,2
Fração DCM	102,3	207,5	190,5	97,7	151,4
Ácido Linoléico	21,8	85	40,7	53,7	135
Ácido Oléico	223,9	79,4	55	69,2	-
Ácido Palmítico	23,2	31	-	-	46,8
Fração AcOEt	37,2	77,3	120,2	79	213,8
Fração F5	23	83,2	-	89	-
Fração BuOH	-	-	-	95,5	-

Nota: os valores não informados correspondem às amostras inativas para as respectivas linhagens.

fosfatidilserina (FS) na membrana plasmática. Quando a célula está entrando em apoptose, um dos sinais para este processo é a exposição do fosfolípido FS na face externa da membrana plasmática. Desta forma, ao incubar as células com anexina-V, esta pode se ligar à FS da membrana nas células que estão entrando em apoptose.⁴

A Figura 2 ilustra os histogramas com a distribuição das células em função da marcação com anexina V-FITC, marcada com fluoresceína (fluorescência detectada pelo canal FL-1). Quanto mais a direita do gráfico, maior a intensidade de fluorescência da anexina nas células, portanto, maior a quantidade de células com a FS na membrana plasmática, isto é, células apoptóticas. A região do histograma mais à esquerda corresponde às células vivas, ou seja, que são anexina negativas e com baixa permeabilidade da membrana ao PI. Por esta figura é possível observar que houve um aumento de 2 vezes na proporção de células na região direita do histograma (células apoptóticas) nos tratamentos com AcOEt, F5

e ácido linoleico, quando comparados ao controle, e de 10 vezes com o ácido palmítico (46%). O MTX mostrou 91% das células em apoptose. Os resultados sugerem que o efeito antitumoral in vitro destas frações pode estar relacionado à indução de apoptose. Roy et al.¹³ apontaram que proantocianidinas isoladas de *Vitis vinifera* promovem apoptose principalmente através de ativação da caspase 3. Enquanto Cury-Boaventura e colaboradores¹⁴ demonstraram que ácidos graxos promovem morte celular para a linhagem Jurkat, modulando a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, apoptose, proliferação, o estresse oxidativo, e os receptores de citocinas.

O ensaio do MTT também foi utilizado para verificar a toxidez de todas as amostras sobre células normais (Figura 3), utilizando para isso linfócitos murinos. As frações HEX e DCM promoveram uma inibição da viabilidade dos linfócitos em 150 e 250 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, o que pode estar associado à presença do ácido oleico nessas amostras. Esse ácido graxo inibiu 60% da viabilidade

dos linfócitos quando testado em 250 $\mu\text{g/ml}$.

De acordo com Cury-Boaventura et al.¹⁵, o ácido oleico, em concentrações elevadas, promove apoptose e necrose de linfócitos humanos através da ativação de caspase 3. Cury-Boaventura e colaboradores¹⁶ ainda verificaram que a mistura de ácidos graxos do tipo ω -6, presente no óleo de soja, pode promover morte de linfócitos e neutrófilos. Esses autores também evidenciaram o efeito tóxico do ácido linoleico sobre linfócitos, porém esse resultado não foi observado no presente trabalho.

CONCLUSÕES

A atividade encontrada mostra que a abordagem etnofarmacológica na escolha de plantas para estudos pode ser útil. A leucemia linfocítica Jurkat foi a linhagem tumoral mais sensível a *B. sartorum*, e as amostras AcOEt, F5, ácido linoleico e ácido palmítico foram as que apresentaram maior ação antitumoral in vitro sobre estas células, estando esta ação antileucêmica possivelmente relacionada à indução de apoptose. Vale ressaltar que as