

Universidade Católica de Pelotas  
Centro de Ciências da Vida e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento/ Mestrado e Doutorado

**Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de extratos das plantas *Jodina rhombifolia* HooK et Arn. e *Carapa guianensis* Aubl sobre células HL-60, Linfoma Daudi e Fibroblastos NIH-3T3**

Gilca Costa Nachtigal

Prof. Dr. Hiram Larangeira de Almeida Junior  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Fátima Tereza Alves Beira

Pelotas, 2011

**GILCA COSTA NACHTIGAL**

**Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de extratos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook.et Arn. e *Carapa guianensis* Aubl. sobre células HL-60, Linfoma Daudi e Fibroblastos NIH-3T3**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, da Universidade Católica de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Comportamento, área do conhecimento: Ciências da Saúde.

**Orientadores:** Prof.Dr Hiram Larangeira de Almeida Junior  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fátima Tereza Alves Beira

## **Agradecimentos**

À minha família, por estarem sempre ao meu lado incondicionalmente, em todos os momentos de minha vida e pelo amor e incentivo sempre constantes;

À Dra Fátima Beira pela orientação na realização do trabalho de cultivo celular, incentivo, carinho, paciência e inestimável amizade e apoio durante todos estes anos;

Ao Dr. Hiram Larangeira pela compreensão, incentivo, apoio e principalmente os conhecimentos fundamentais para a conclusão deste trabalho e exemplo de pesquisador;

À equipe do laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pelotas, pela ajuda na realização dos experimentos;

À Karine Begnini pela ajuda fundamental na realização dos experimentos celulares;

Ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da UFPEL por possibilitar a realização deste projeto em suas instalações e pelo carinho de todos;

Ao Dr. Francisco Del Pino pela oportunidade, carinho, paciência, conhecimentos e confiança depositados em mim durante este processo;

À Luciana Quevedo pela simpatia e ajuda na realização das análises estatísticas;

À Roberta pela recepção e simpatia nestes momentos finais de conclusão na Secretaria do Programa de Pós-graduação;

Ao Diretor do Hemocentro Regional de Pelotas pela liberação para a realização deste trabalho;

Aos amigos que sempre me apoiaram durante toda minha vida;

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

## Sumário

	Pág.
<b>Resumo</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1. Introdução</b> .....	3
<b>2. Justificativa</b> .....	17
<b>3. Perspectivas Terapêuticas</b> .....	18
<b>4. Objetivos</b> .....	19
<b>5. Hipóteses</b> .....	20
<b>6. Materias e Métodos</b> .....	21
<b>6.1. Materiais</b> .....	21
6.1.1. Plantas Medicinais.....	21
6.1.2. Linhagens Celulares .....	22
6.1.2.1.Linhagem de Leucemia Mielóide Aguda (HL-60) .....	22
6.1.2.2. Linhagem de Linfoma Daudi .....	22
6.1.2.3. Linhagem de Fibroblastos (NIH-3T3) .....	23
6.1.3. Meios de Cultivo .....	23
6.1.3.1. Meio RPMI 1640 .....	23
6.1.3.2. Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) .....	24
6.1.4. Soro Bovino Fetal .....	24
6.1.5. Soluções .....	25
6.1.5.1. Solução Tampão de Fosfato (PBS).....	25
6.1.5.2. Solução de Tripsina-EDTA .....	25
6.1.5.3. Solução de Sulforodamina B (SRB) .....	25
6.1.5.4. Solução Tampão Tris Base .....	25
6.1.5.5. Ácido Tricloacético 50% (p/v) TCA .....	26
6.1.5.6. Ácido Tricloacético 80% (p/v) TCA .....	26
6.1.5.7. Ácido Acético 1% .....	26
6.1.5.8. Corante Azul de Trypan 0,4% .....	26
6.1.5.9. Dimetilsulfóxido (DMSO) .....	26
6.1.6. Equipamentos .....	27
<b>6.2. Métodos</b> .....	27
6.2.1. Delineamento .....	27
6.2.2. Preparo dos extratos .....	28
6.2.2.1. Preparo dos extratos da planta <i>Jodina rhombifolia</i> Hook et Arn....	28
6.2.2.2. Preparo dos extratos da planta <i>Carapa guianensis</i> Aubl.....	30
6.2.2.3. Solubilização dos extratos para testes citotoxicidade .....	31
6.2.3. Técnica de Cultivo Celular .....	32

6.2.4. Contagem Celular .....	34
6.2.5. Avaliação atividade citotóxica .....	35
6.2.6. Ensaios Colorimétricos .....	38
6.2.7. Cálculo dos parâmetros de Citotoxicidade Celular .....	41
6.2.8. Análise Estatística .....	42
6.2.9. Fluxograma ensaios atividade antiproliferativa .....	43
6.3. Aspectos Éticos .....	44
<b>7. Resultados</b> .....	44
7.1. Atividade Inibitória sobre Leucemia Mielóide Aguda-HL60 .....	44
7.2. Comparação da atividade citotóxica de todos os extratos sobre HL-60.	48
7.3. Atividade Inibitória sobre a Linhagem Linfoma Daudi .....	49
7.4. Comparação da atividade citotóxica de todos os extratos sobre a linhagem Linfoma Daudi .....	52
7.5. Atividade Inibitória sobre Fibroblastos- NIH-3T3 .....	53
7.6. Comparação da atividade citotóxica de todos os extratos sobre a linhagem Fibroblastos- NIH-3T3 .....	57
<b>8. Discussão</b> .....	58
<b>9. Referências Bibliográficas</b> .....	67
<b>Artigo Científico</b> .....	77

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.....21
- Figura 2.** Planta e sementes da *Carapa guianensis* Aubl.....22
- Figura 3:** Esquema de preparação dos extratos aquoso (**JRA**) e metanólico (**JRM**) da *Jodina rhombifolia*.....29
- Figura 4:** Esquema de preparação dos extratos de éter de petróleo (**CEP**) e metanólico (**CEM**) utilizado pelo Laboratório de Oleoquímica (DQO-UFPEl) das sementes de *Carapa guianensis*.....31
- Figura 5:** Representação esquemática do teste da atividade citotóxica em placa Tempo Zero  $T_0$  de ELISA<sup>®</sup> para células HL-60.....36
- Figura 6:** Representação esquemática do teste da atividade citotóxica em placa de testes ELISA<sup>®</sup> das diferentes concentrações dos extratos *Jodina rhombifolia* (**JRA**) e (**JRM**) e controles sobre células HL-60 – *screening*.....37
- Figura 7.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato aquoso da *Jodina rhombifolia* (**JRA**), sobre a linhagem HL-60.....46
- Figura 8.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato metanólico da *Jodina rhombifolia* (**JRM**), sobre a linhagem HL-60.....46
- Figura 9.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato éter de petróleo da *Carapa guianensis* (**CEP**), sobre a linhagem HL-60.....47
- Figura 10.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato metanólico da *Carapa guianensis* (**CEM**), sobre a linhagem HL-60.....47
- Figura 11.** Atividade citotóxica dos extratos, aquoso e metanólico, da *Jodina rhombifolia* (JRA E JRM) e dos extratos de éter de petróleo e metanólico da *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem HL-60.....48
- Figura 12.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato aquoso da *Jodina rhombifolia* (**JRA**), sobre a linhagem Linfoma Daudi.....50

<b>Figura 13.</b> Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato metanólico da <i>Jodina rhombifolia</i> (JRM), sobre a linhagem Linfoma Daudi.....	51
<b>Figura 14.</b> Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato de éter de petróleo da <i>Carapa guianensis</i> (CEP), sobre a linhagem Linfoma Daudi.....	51
<b>Figura 15.</b> Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato metanólico da <i>Carapa guianensis</i> (CEM), sobre a linhagem Linfoma Daudi.....	52
<b>Figura 16.</b> Atividade citotóxica dos extratos, aquoso e metanólico, da <i>Jodina rhombifolia</i> (JRA E JRM) e dos extratos de éter de petróleo e metanólico da <i>Carapa guianensis</i> (CEP e CEM) sobre a linhagem Linfoma Daudi.....	53
<b>Figura 17.</b> Atividade citotóxica do extrato aquoso da <i>Jodina rhombifolia</i> (JRA), sobre a linhagem controle de Fibroblastos- NIH-3T3.....	55
<b>Figura 18.</b> Atividade citotóxica do extrato metanólico da <i>Jodina rhombifolia</i> (JRM), sobre a linhagem controle de Fibroblastos- NIH-3T3.....	56
<b>Figura 19.</b> Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato de éter de petróleo da <i>Carapa guianensis</i> (CEP), sobre a linhagem controle de Fibroblastos- NIH-3T3.....	56
<b>Figura 20.</b> Atividade citotóxica do extrato metanólico da <i>Carapa guianensis</i> (CEM), sobre a linhagem controle de Fibroblastos–NIH-3T3.....	57
<b>Figura 21.</b> Atividade citotóxica dos extratos, aquoso e metanólico, da <i>Jodina rhombifolia</i> (JRA E JRM) e dos extratos de éter de petróleo e metanólico da <i>Carapa guianensis</i> (CEP e CEM) sobre a linhagem controle de Fibroblastos- NIH-3T3.....	58

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Médias da porcentagem da proliferação e morte celular da linhagem HL-60 mediante exposição de 72h aos extratos testados (JRA, JRM, CEP e CEM), nas diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões em relação ao controle.....45
- Tabela 2.** Resultados dos valores de  $CI_{50}$  e CIT obtidos dos extratos de *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem HL-60.....48
- Tabela 3.** Médias da porcentagem de proliferação e morte celular da linhagem de Linfoma Daudi, mediante exposição de 72h aos extratos testados (JRA, JRM, CEP e CEM), nas cinco diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões em relação ao controle.....50
- Tabela 4.** Resultados dos valores de  $CI_{50}$  e CIT obtidos dos extratos de *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem Linfoma Daudi.....52
- Tabela 5.** Médias da porcentagem da proliferação celular da linhagem controle de Fibroblastos-NIH-3T3, mediante exposição de 72h aos extratos testados (JRA, JRM, CEP e CEM), nas diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões em relação ao controle.....55
- Tabela 6.** Resultados dos valores de  $CI_{50}$  e CIT obtidos dos extratos de *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem controle de Fibroblastos-NIH-3T3.....57



## LISTA DE ABREVIATURAS

ATRA: Ácido all-trans retinóico  
BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro/RJ/Brasil  
BRMs: Modificadores da Resposta Biológica  
Bx-PC3: Linhagem celular representativa de Adenocarcinoma de pâncreas  
C: Densidade óptica correspondente aos cultivos controle  
CBIO: Comissão Interna de Biossegurança da UFPel  
CD: Antígeno de Diferenciação Celular  
CEM: Extrato metanólico da planta *Carapa guianensis* Aubl.  
CEP: Extrato etérico da planta *Carapa guianensis* Aubl.  
CI<sub>50</sub>: Concentração inibitória capaz de reduzir 50% do crescimento celular  
CIT: Concentração Inibitória Total  
CNPQ: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
DMEM: Meio de Cultivo Celular  
DNA: Acido desoxidoribonucléico  
DO: Densidade óptica  
EBV: Vírus Epstein-Barr  
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Teste Imunoenzimático)  
EUA: Estados Unidos da América  
FAB: Classificação Franco-Americano-Britânica  
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana  
HL-60: Linhagem celular representativa de Leucemia Mielóide Aguda  
HT-29: Linhagem celular representativa de Adenocarcinoma de cólon  
HTLV1: Vírus T-Linfotrópico Humano tipo 1  
IARC: Agência Internacional para Pesquisa em Câncer  
INCA: Instituto Nacional de Câncer/ Brasil  
JRA: Extrato Aquoso da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.  
JRM: Extrato Metanólico da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.  
K-562: Linhagem celular representativa de Leucemia Mielóide Crônica  
KB: Linhagem celular representativa de Carcinoma de Boca  
LB: Linfoma de Burkitt  
LH: Linfoma Hodgkin  
LLA: Leucemia Linfóide Aguda  
LMA: Leucemia Mielóide Aguda  
LNH: Linfoma Não-Hodgkin  
Log<sub>10</sub>: Logarítmo na Base 10  
LPA: Leucemia Mielóide Aguda prómielocítica  
MC: Meio de Cultura Celular  
MCF-7: Linhagem celular representativa de Adenocarcinoma de glândula mamária  
MDR: Resistência à múltiplas Drogas  
MTT: Técnica de Ensaio Colorimétrico baseada na redução metabólica do sal tetrazólio  
NC: Número de células presentes na garrafa de cultivo celular  
NCI: National Cancer Institute / USA

NCV: Média aritmética do número de células contadas em cinco quadrantes em Câmara de Neubauer  
ND: Resultado não detectado nas concentrações testadas para  $CI_{50}$  e CIT  
NIH-3T3: Linhagem celular representativa de Fibroblastos murinos  
OMS/ WHO: Organização Mundial para Saúde  
PANC-1: Linhagem celular representativa de Adenocarcinoma de pâncreas  
PBS Solução Tampão de Fosfato  
RC: Remissão Completa  
REAL: Classificação *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*  
REH: Linhagem celular representativa de Leucemia Linfóide Aguda  
RPMI: Meio de cultivo celular  
SAR: Síndrome retinóide  
SBF: Soro Bovino Fetal inativado  
SPSS13.0: Software Sigmastat 2.0 (SSPS, Chicago, IL, USA)  
SRB: Sulforodamina B  
T: Valor de densidade óptica do cultivo celular ao final do experimento  
T0: Densidade óptica correspondente ao número de células em cultivo a tempo Zero  
TCA: Ácido tricloroacético  
TMO: Transplante Medula Óssea

**Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de extratos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook.et Arn. e *Carapa guianensis* Aubl. sobre células HL-60, Linfoma Daudi e fibroblastos NIH-3T3**

**Resumo**

**Introdução** - A incidência de câncer aumenta anualmente, sendo uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Sessenta por cento dos quimioterápicos são derivados de fontes naturais.

**Objetivo** - O presente trabalho objetivou avaliar a atividade antiproliferativa de extratos obtidos a partir de folhas da *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. (metanólico e aquoso) e de sementes de *Carapa guianensis* Aubl. (metanólico e etérico).

**Métodos** - A atividade dos extratos foi avaliada por ensaio colorimétrico com Sulforodamina B (SRB) sobre as linhagens celulares tumorais humanas de Leucemia Mielóide Aguda (HL-60), Linfoma Daudi e fibroblastos embrionários murinos (NIH-3T3), como células controle. As linhagens celulares foram cultivadas em placas de microculturas, e foram incubadas com cinco concentrações diferentes dos extratos (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL) por um período de 72 horas. Para determinar o efeito antiproliferativo foi realizada leitura das placas em espectrofotômetro. Com os resultados obtidos a partir das concentrações testadas de cada extrato, foi gerada uma curva dose-resposta e determinadas a CI<sub>50</sub> e CIT. Para análise estatística dos resultados, usou-se o teste de regressão linear para as diferentes concentrações. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

**Resultados** - O extrato metanólico da *Carapa guianensis* foi o que apresentou maior atividade antiproliferativa sobre a linhagem HL-60, com CI<sub>50</sub>=12,6 µg/mL e CIT=80,5 µg/mL ( $p < 0.05$ ). Sobre a linhagem Linfoma Daudi o extrato aquoso da *Jodina rhombifolia* apresentou melhor efeito, com CI<sub>50</sub>=41,09 µg/mL e CIT=55,90 µg/mL ( $p < 0.05$ ). Não houve inibição estatisticamente significativa nos controles ( $p > 0.05$ ).

**Discussão**- Esses resultados demonstram que os extratos obtidos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn e *Carapa guianensis* Aubl têm efeito antiproliferativo em células neoplásicas de origem hematopoiéticas, sendo aconselhado expandir essas pesquisas, buscando obter fármaco que venha a ter utilização clínica.

**Palavras Chaves:** Leucemia; linfoma; fitoterapia; cultura de células

***In vitro* anti-proliferative activity of extracts from *Jodina rhombifolia* Hook & Arn. and *Carapa guianensis* Aubl. on HL-60 cells, Daudi lymphoma and NIH-3T3 fibroblasts**

**Abstract**

**Introduction-**The incidence of cancer increases annually and is considered one of the main causes of mortality worldwide. Sixty-percent of chemotherapics were obtained from natural sources. **Objective** - this study aimed to assess the antiproliferative activity of extracts from leaves of *Jodina rhombifolia* Hook. Et Arn. (methanolic and watery) and seeds of *Carapa guianensis* Aubl. (methanolic and etheric). **Methods** - The extract activity was assed by sulforhodamine B colorimetric assay (SRB) on human tumor cell lines of acute myeloid leukemia (HL-60), Daudi Lymphoma and mouse embryonic fibroblasts (NIH-3T3), as control cells. The cell lines were grown using microculture plates and were incubated with five different extract concentrations (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL) for 72 hours. The anti-proliferative effect was determined by the use of a microplate reader spectrophotometer. With the obtained results a dose-response curve was generated and the IC<sub>50</sub> and ICT values were determined. For statistical analysis the was used with linear regression for different concentrations. The p<0.05 values were considered statistically significant. **Results** – The methanolic extract from *Carapa guianensis* presented the highest anti-proliferative activity on HL-60 line, with IC<sub>50</sub> = 12.6 µg/mL and ICT = 80.5 µg/mL (p<0.05). On Daudi Lymphoma line, the aqueous extract of *Jodina rhombifolia* presented the best effect: CI<sub>50</sub> = 41.09 µg/mL and ICT = 55.90 µg/mL (p<0.05). No statistically significant inhibition was found in control cells (p>0.05). **Discussion-** The results showed that the extracts obtained from the plants *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. and *Carapa guianensis* Aubl. have anti-proliferative effect on neoplastic cells of hematopoietic origin. Further studies are necessary to obtain new drugs for clinical use.

**Keywords:** Leukemia; lymphoma; phytotherapy; cell culture

## 1- INTRODUÇÃO

O câncer configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, sua incidência aumenta anualmente. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano surgem dez milhões de novos casos e cinco milhões de pessoas vão a óbito em decorrência dessa doença. No Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte por doenças, sendo a primeira representada pelas doenças cardiovasculares. Acomete cerca de cem mil indivíduos anualmente, com ligeira predominância do sexo masculino. Nas últimas décadas, o registro brasileiro de câncer tem apresentado um acréscimo no número de casos novos, ressaltando a importância da doença, seu impacto social e econômico, gravidade dos sintomas físicos e psicológicos<sup>1</sup>.

De acordo com a OMS após o ano de 2020, 20 milhões de pacientes, a cada ano, serão vítimas dessa doença sendo que 70% da população residem em países onde os recursos para o controle do câncer são insuficientes<sup>2</sup>.

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) /OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. A IARC/OMS estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorreriam nessas localidades. Em 2008, a IARC/OMS estimou que ocorressem 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo<sup>1,3</sup>.

No Brasil, estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para os anos de 2010/ 2011 apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram as menores. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário. O Rio Grande do Sul é o terceiro estado em número de casos novos de câncer, com a estimativa de

ocorrência de 48.930 novos casos, ficando atrás somente de São Paulo e Rio de Janeiro com 136.060 e 55.950 casos novos, respectivamente<sup>1</sup>.

Destes estima-se uma incidência de leucemias que varia de acordo com as regiões do Brasil. O Rio Grande do Sul apresenta a maior incidência, tanto pra homens com 7,75 casos para cada 100.000 homens, como para as mulheres com 6,01 casos para cada 100.000 mulheres. O estado de Roraima foi o que apresentou a menor incidência com 2,96 e 1,36 por 100.000, para homens e mulheres, respectivamente<sup>1</sup>.

A célula cancerígena caracteriza-se pela alteração de função em consequência da incompleta diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástase. A origem dessa célula é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos<sup>4,5</sup>.

Existem três abordagens principais para lidar com o tratamento do câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, e o papel de cada uma delas depende do tipo de tumor e de seu estágio de desenvolvimento. A cirurgia foi a primeira modalidade de tratamento que significativamente alterou o curso de uma neoplasia e consiste na retirada física do tecido maligno sendo eficiente somente nos casos em que o tumor é circunscrito, anatomicamente favorável e não apresenta metástases<sup>6</sup>.

A radioterapia é utilizada para tumores localizados que não puderam ser extraídos totalmente ou aqueles que apresentaram alta taxa de recidivas locais após a cirurgia. Essa técnica consiste em expor as células malignas à radiação ionizante, pois ela possui características físicas que promovem a ionização do meio incidente, alterando as macromoléculas que são indispensáveis às funções vitais, levando as células à morte. A radioterapia é somente efetiva nas células que estão em divisão, possuindo graves efeitos colaterais, provocando lesões nos tecidos normais e adjacentes<sup>6</sup>.

A quimioterapia é um dos métodos mais utilizados e consiste no uso de agentes citotóxicos ou anti-hormonais, que eliminam as células neoplásicas

diminuindo, assim o crescimento da massa tumoral e a proliferação desordenada das células. A quimioterapia com fármacos citotóxicos, os quais danificam ou matam as células, é o principal método de tratamento de alguns cânceres, mas tem tido uso crescente como adjuvante da cirurgia ou da radioterapia em vários tipos de tumor<sup>7</sup>.

A introdução da quimioterapia aumentou significativamente os índices de cura de alguns tumores, em especial das neoplasias hematológicas, as quais não eram controladas com sucesso pelo emprego da cirurgia ou radioterapia<sup>7</sup>.

A maioria dos agentes utilizados em quimioterapia atua inibindo a síntese de DNA ou mecanismos de replicação celular, mas acabam por apresentar melhor atividade “antiproliferativa” do que “antineoplásica”. Sendo assim, a seletividade entre células normais e tumorais torna-se modesta e os efeitos colaterais acentuados. Além disso, a toxicidade dessas drogas limita seu uso já que a maioria dos cânceres humanos são quimiorresistentes e ainda, podem causar danos ao DNA de células normais induzindo a formação de uma segunda neoplasia<sup>8</sup>.

Adicionalmente à cirurgia, irradiação e quimioterapia, a imunoterapia consiste numa importante terapia de combate ao câncer. A imunoterapia e a bioterapia incluem abordagens tais como Modificadores da Resposta Biológica (BRMs), citocinas, transplantação de linfócitos, terapia gênica, bem como ervas e alternativas medicinais<sup>8</sup>.

Entre os quimioterápicos provenientes de espécies vegetais podemos destacar os alcalóides obtidos da *Catharanthus roseus*, conhecida também como *Vinca rosea*, utilizada pela população de Madagascar no tratamento do diabetes. Durante os testes de atividade hipoglicemiante, os extratos dessa espécie produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais, sugerindo avaliação em modelos de leucemias e linfomas. A confirmação da atividade antitumoral nesses modelos levou ao isolamento dos alcalóides vimblastina e vincristina, os quais são de grande utilidade no tratamento tanto de neoplasias de origem mielóide e linfóide (leucemias e linfomas) como de tumores ditos como sólidos<sup>9,10,11</sup>.

O potencial da descoberta e desenvolvimento de novas drogas a partir de extratos vegetais ainda é considerado pouco explorado. Estima-se que existam cerca de 250 a 500 mil espécies vegetais e somente 5 a 15% destas foram estudadas do ponto de vista farmacológico<sup>11</sup>.

O Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI) estudou cerca de 30 mil amostras entre 1960 a 1982, resultando em 23 substâncias ativas, mas ainda existem 20 mil extratos que deverão ser submetidos a testes de avaliação da atividade antitumoral<sup>9, 11</sup>.

Dentre as neoplasias, as hematológicas constituem um grupo bastante distinto, não apenas pelas manifestações clínicas usualmente muito severas, mas, também, pelo seu tratamento agressivo e grande morbi-mortalidade, principalmente as leucemias, que são decorrentes do desequilíbrio entre as taxas de proliferação, maturação e apoptose das células hematopoiéticas comumente associadas a polimorfismos gênicos.

As leucemias podem ser classificadas em agudas, as com início e evolução rápidos, e as crônicas de início e evolução lentos.

As leucemias agudas são caracterizadas por acúmulo excessivo de células imaturas na medula óssea. O evento leucemogênico ocorre em uma célula progenitora (mielóide ou linfóide), e associado a uma proliferação aumentada ocorre um bloqueio da maturação, impedindo a diferenciação celular. As leucemias agudas dividem-se em mielóides (LMA), linfóides (LLA) ou bifenotípicas quando apresentam marcadores das duas linhagens<sup>12</sup>. A LMA compreende um grupo heterogêneo de doenças malignas da medula óssea com apresentação clínica semelhante, mas diferentes características morfológicas, citogenéticas e imunofenotípicas, além de um curso clínico e perfil de resposta ao tratamento que depende do subtipo e de fatores prognósticos. Tal enfermidade ocorre em qualquer idade, sendo mais comum em adultos, com frequência aumentada em idosos. Embora seja uma doença relativamente rara, representando cerca de 1,2% dos óbitos causados por doenças oncológicas nos Estados Unidos, espera-se um aumento da sua incidência devido ao envelhecimento da população<sup>13</sup>.



A apresentação clínica é semelhante em todas as idades e resulta da infiltração da medula óssea por células neoplásicas (blastos malignos), resultando na diminuição da hematopoiese normal com consequente queda nas contagens normais de elementos figurados no sangue periférico, o que causa os principais sintomas da doença: anemia, sangramentos e infecção. A célula envolvida pertence à série mielóide, um dos três setores hematopoéticos<sup>13</sup>.

A LMA é classificada em subgrupos de acordo com a célula envolvida e seu grau de diferenciação, o que contribui para as diferenças encontradas na resposta terapêutica e no comportamento clínico. Este pleomorfismo motivou o estabelecimento de várias classificações, destacando-se a franco-americano-britânica (FAB) que foi inicialmente proposta em 1976 e permanece amplamente utilizada até hoje. Tal classificação divide os subtipos das LMAs de acordo com a morfologia da célula neoplásica na medula óssea em sete subgrupos de M0 a M7, que são:

M0- Leucemia Mielóide Aguda minimamente diferenciada;

M1- Leucemia Mielóide Aguda sem maturação;

M2- Leucemia Mielóide Aguda com maturação;

M3- Leucemia Mielóide Aguda prómielocítica (LPA)

M4- Leucemia Mielóide Aguda mielo-monocítica

M5- Leucemia Mielóide Aguda monocítica

M6- Leucemia Eritróide Aguda ou Eritroleucemia

M7- Leucemia Megacarioblástica.

A leucemia mieloide aguda é uma doença potencialmente curável; a chance de cura de um paciente depende diretamente da quantidade de *fatores de prognóstico* acumulados por ele<sup>12,13</sup>.

Apesar de corresponder aproximadamente a 20% das leucemias na infância, responde por mais de 30% das mortes por leucemia. Mesmo com a evolução no tratamento das crianças com LMA nos últimos trinta anos, a sobrevivência livre de doença continua a ser em torno de 50% na maioria dos centros<sup>13</sup>.

De acordo com o Instituto Nacional de Combate ao Câncer (Inca) em estudo realizado entre 1991 e 2006, em nosso país, a leucemia foi o câncer que mais afetou a faixa etária de 0 a 18 anos e foi a que apresentou maior mortalidade (35%). O levantamento apontou, inclusive, que crianças entre 1 e 4 anos foram as mais afetadas, com 31,6% dos casos registrados. Dezenove estados e o Distrito Federal fizeram parte do estudo. A leucemia apresentou um percentual médio de 29% de frequência no país, a ocorrência de casos variou nas capitais analisadas. Salvador teve a menor taxa, com 25,5 casos do sexo masculino para cada 1 milhão de pessoas, e 18,6 do sexo feminino, na mesma proporção. Já em Cuiabá e Curitiba foram observadas as maiores taxas de incidência, com 90,6 casos e 69,9 casos para cada 1 milhão de pessoas, respectivamente<sup>1</sup>.

Dentre as LMA destacamos a leucemia promielocítica (LPA) devido a seu comportamento inicial bastante agressivo com apresentação clínica típica, ocorrendo sangramentos secundários à coagulação intravascular disseminada em 90% dos casos, o que confere um prognóstico inicial bastante reservado<sup>14</sup>.

A LPA caracteriza-se pelas translocações recorrentes envolvendo o cromossomo 17 e a ativação do gene  $RAR\alpha$ , sendo mais frequente a  $t(15; 17)$  e seu gene fusionado  $PML/RAR\alpha$ , que é utilizado tanto para diagnóstico como para estudo de doença residual mínima. A introdução do Ácido all-trans retinóico (ATRA) como terapia padrão na indução, modificou o prognóstico deste grupo de pacientes e a combinação com antracíclicos leva à alta taxa de remissão completa (RC), superior a 90% e de sobrevida livre de doença em três anos de cerca de 80%<sup>12, 13</sup>. A maior complicação do uso do ATRA é a síndrome retinóide (SAR), caracterizada por febre, ganho de peso, desconforto respiratório, anasarca, infiltrados pulmonares, derrame pleural e/ou pericárdico, disfunção cardíaca e/ou renal e hipotensão. A incidência de SAR varia de 10% a 30% e está associada à elevada mortalidade. No Brasil, a taxa de mortalidade nos primeiros sete dias de tratamento obtida de sete grandes centros nacionais foi de 20% para LPA. Resistência aos quimioterápicos é um dos grandes motivos de falhas no tratamento da leucemia mielóide aguda, com isso torna-se necessária a busca de

novos fármacos visando um sinergismo de tratamentos, com menos riscos ao portador de LPA<sup>13</sup>.

Os linfomas constituem um grupo de doenças neoplásicas que se originam de células do sistema imunológico. São os tumores sanguíneos mais comuns (mais que as leucemias) e estão entre os 10 cânceres mais incidentes no mundo. Podem acometer desde crianças até idosos, ocorrem devido a um dano ao DNA de uma célula precursora de um linfócito, esse dano ocorre após o nascimento e representa, portanto, uma doença adquirida e não hereditária. O prefixo “linfo” indica sua origem a partir da transformação de um linfócito, e o sufixo “oma” é derivado da palavra grega que significa “tumor”<sup>13</sup>.

Os linfomas geralmente têm início nos linfonodos (gânglios linfáticos), podendo acometer qualquer dos linfonodos contidos e distribuídos nas diversas regiões do corpo: periféricos ou profundos. Em alguns casos, podem envolver a medula óssea, bem como outros órgãos tais como sistema nervoso central, testículos, pele, entre outros<sup>13</sup>.

Os diferentes linfomas são atualmente reconhecidos como “entidades” independentes, definidas por um conjunto de características de acordo com a célula normal que deu origem à neoplasia, o aspecto histológico, a imunofenotipagem, as peculiaridades clínicas e epidemiológicas e os defeitos genéticos e moleculares<sup>13</sup>.

Ele foi descrito pela primeira vez em 1839 por Thomas Hodgkin, médico inglês. Desde então, foram descritos mais de 40 subtipos, que se diferenciam pela linhagem das células e por alterações a nível molecular.

Hoje, classificam-se os linfomas em 2 grandes grupos: os **Linfomas de Hodgkin** e os **Linfomas não-Hodgkin**. Ambos têm apresentação clínica semelhante, porém, dependendo do seu subtipo, o prognóstico é variável.

A incidência do linfoma de Hodgkin atinge um pico de 5 a 6 casos/100.000 indivíduos em torno de 20 anos de idade. Essa taxa cai para menos da metade na meia idade e volta a aumentar em frequência em indivíduos mais idosos. Esse padrão difere entre grupos étnicos, com maior frequência em

indivíduos mais jovens (de 10 a 40 anos) de descendência europeia, do que naqueles de descendência africana, asiática ou hispânica<sup>13</sup>.

O linfoma de Hodgkin (LH) é uma doença tratável em qualquer estágio e curável em cerca de 80% dos casos. A classificação histológica proposta pela OMS divide a neoplasia em LH predominância linfocítica nodular e LH clássico (WHO, 2004). A forma clássica é subdividida nos tipos esclerose nodular, celularidade mista, depleção linfocitária e rico em linfócitos<sup>15</sup>.

Os linfomas não-hodgkin (LNH) constituem um grupo heterogêneo de neoplasias, com grande variedade de padrões histológicos e diferentes comportamentos biológicos. Em relação à epidemiologia, os LNH ocupam a quinta posição entre as neoplasias diagnosticadas e a mesma posição em relação às causas de morte por câncer nos EUA<sup>1,13</sup>.

A etiologia dos LNH, como outras neoplasias, é multifatorial. Em 50% dos linfomas de células B, podem ser identificadas translocações cromossômicas recorrentes, como t (14; 18)<sup>13</sup>.

Apresenta importante variação geográfica em sua distribuição com incidência crescente nos últimos 40 anos. O número de casos praticamente duplicou nos últimos 25 anos, particularmente entre pessoas acima de 60 anos por razões ainda não esclarecidas<sup>1</sup>.

A incidência do LNH aumenta progressivamente com a idade. Em torno de quatro casos/100 mil indivíduos ocorrem na faixa dos 20 anos. A taxa de incidência aumenta até dez vezes, passando para 40 casos/100 mil indivíduos aos 60 anos, e mais de 20 vezes, chegando a 80 casos/100 mil indivíduos após os 75 anos<sup>1,16</sup>.

Pessoas infectadas pelos vírus HIV, Epstein-Barr (EBV), HTLV1 e pela bactéria *Helicobacter Pylori*, apresentam maior risco de desenvolver linfoma. A exposição a componentes químicos de herbicidas e pesticidas também está associada à sua ocorrência, assim como a exposição à radiação<sup>16,17,18</sup>.

Os LNH podem ser indolente (de crescimento lento), agressivo (de crescimento rápido) ou possuir características de ambos os tipos. O linfoma de células B é o tipo mais comum e o linfoma de células T o menos comum. Devido

à existência de vários tipos e subtipos de LNH, é muito importante saber o diagnóstico correto para se instituir o tratamento mais adequado<sup>13,16</sup>.

A Working Formulation permitiu subdividir os LNH de acordo com os grupos prognósticos que apresentavam importância clínica. Esta foi sua grande contribuição. Os LNH foram divididos em três categorias: baixo, intermediário e alto grau de malignidade, de acordo com as curvas de sobrevida<sup>16</sup>.

A maioria dos linfomas é tratada com quimioterapia, radioterapia, ou ambos. A imunoterapia está sendo cada vez mais incorporada ao tratamento, incluindo anticorpos monoclonais e citocinas, isoladamente ou associados à quimioterapia<sup>13</sup>.

Os LNH de baixo grau e intermediário predominam em adultos, enquanto que mais de noventa por cento das crianças com LNH tem tumores de alto grau.

Destacaremos o linfoma de Burkitt (LB), um subtipo histológico do LNH de alto grau, que apresenta comportamento agressivo relacionado a mudanças citogenéticas na expressão do protooncogene c-myc<sup>13,17</sup>.

O LB é uma neoplasia de células B classificada pelo *National Cancer Institute Working Formulation* como linfoma de células pequenas não-clivadas. Em relação à classificação *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms* (REAL), a forma clássica, com aspecto celular monomorfo, recebeu a denominação linfoma de Burkitt. A caracterização do imunofenótipo é fundamental para o diagnóstico, uma vez que a maioria dos casos de LB apresenta marcadores de células B positivos, sendo eles: CD10, CD19, CD20, CD22, e CD79a<sup>17</sup>.

É mais comum em crianças, correspondendo à cerca de 40% dos linfomas nessa faixa etária. Quando incide em adultos está frequentemente relacionado à imunodeficiência, sendo raro em adultos imunocompetentes. Incide duas a três vezes mais no sexo masculino que no feminino. A presença do EBV é comum em mais de 70% dos casos. O tipo A do EBV é mais comum, aparecendo em até 90% dos casos em que há envolvimento do vírus, sugerindo

que a imunodeficiência não é tão importante na patogênese da doença do LB brasileiro, em contraste com a forma africana<sup>13,17</sup>.

Considerando-se a alta taxa de crescimento do LB, o diagnóstico e o estadiamento rápidos são essenciais para o sucesso terapêutico. O tratamento de escolha é a quimioterapia sistêmica com múltiplas drogas. A radioterapia fica restrita a casos de emergência, em que se necessita reduzir rapidamente o tamanho do tumor, como nos casos de compressão mediastinal e nos casos de envolvimento meníngeo. O transplante de medula óssea (TMO) autólogo é o tratamento de escolha nos casos de recaída do tumor<sup>19</sup>.

A existência de linhagens celulares derivadas de tumores, as quais podem ser convenientemente e continuamente mantidas *in vitro*, tem favorecido vários tipos de estudos, possibilitando a elucidação de mecanismos de ação de substâncias ativas<sup>20</sup>. Principalmente o uso de linhagens celulares hematológicas tem facilitado investigações mais objetivas quanto aos efeitos de agentes com potencial anti-neoplásico<sup>21,22</sup>.

A linhagem celular HL-60 é derivada de paciente acometido por uma leucemia promielocítica aguda, em cultura, é constituída por mieloblastos ou promielócitos, embora 5-10% destas células podem se diferenciar espontaneamente em granulócitos mais maduros, incluindo mielócitos, metamielócitos e neutrófilos bastonetes e segmentados<sup>23</sup>. Estas células coram-se fortemente com corantes específicos para células mielóides, incluindo mieloperoxidase, esterase cloroacetato ASD e Negro de Sudão B. Entretanto, não foi notada reação com fosfatase alcalina, um corante de positividade característica em granulócitos neutrofílicos normais<sup>23</sup>.

A linhagem Daudi é derivada de paciente acometido pelo Linfoma de Burkitt. Esta linhagem é extensivamente utilizada em estudos que tentam elucidar os mecanismos de origem das leucemias, sendo bem caracterizada como uma linhagem linfoblástica do tipo B. Suas células dão reação positiva para o antígeno nuclear do vírus Epstein Barr (EBNA), assim como também para o antígeno do capsídeo viral do mesmo vírus (VCA) e imunoglobulinas de superfície, sendo negativa para b2-microglobulina<sup>24,25</sup>.

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar a influência de extratos de diferentes plantas medicinais sobre linhagens de células leucêmicas, na tentativa preliminar de identificar agentes antitumorais eficientes derivados da natureza.

O câncer continua representando uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares, infecções e doenças parasitárias, responsáveis por, respectivamente, 30 e 19% das mortes. No ano de 2000, 10 milhões de novos casos de câncer foram registrados mundialmente. O crescimento da população, associado ao envelhecimento, às mudanças de hábitos e fatores ambientais que vêm se verificando no planeta, implicam em uma incidência progressiva de novos casos de câncer. Estudos indicam que, mesmo que os dados atuais permaneçam inalterados, cerca de 15 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes são esperados para o ano de 2020<sup>26</sup>.

Há uma necessidade constante de identificar, avaliar e buscar novos e mais efetivos fármacos para o tratamento de vários tipos de câncer. Esse processo tem início pela identificação de novos princípios ativos obtidos de diversas fontes<sup>27</sup>.

A importância das plantas medicinais está na sua contribuição como fonte natural de fármacos e, por proporcionar grandes possibilidades de obtenção de novas substâncias, devido à diversidade de constituintes químicos presentes na sua composição. No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável<sup>28</sup>.

A busca de agentes anticancerígenos derivados de produtos naturais, além de proporcionar instrumentos farmacológicos para o estudo de funções fundamentais como o crescimento e divisão celular, função imune, carcinogênese e sua regulação, permitiu a descoberta de novos alvos de ação farmacológica, tais como moléculas fundamentais na mitose celular (inibidores de microtúbulos) ou

proteínas implicadas na replicação do DNA (inibidores de topoisomerasas), utilizados no tratamento de diversos tipos de cânceres<sup>29</sup>.

Quando extratos ou frações de produtos naturais demonstram efetividade frente a modelos tumorais experimentais padronizados, procede-se com o fracionamento e purificação, até a identificação e isolamento do princípio ativo responsável pelo efeito e obtenção de derivados sintéticos visando melhorar sua ação e reduzir sua toxicidade<sup>30</sup>.

A extração de produtos de plantas com supostas propriedades terapêuticas tem conduzido a obtenção de numerosos compostos purificados com ação farmacológica bem definida e mostram uma grande diversidade de atividades terapêuticas, analgésicas e antitumorais<sup>28</sup>.

A medicina popular de diferentes culturas tem proporcionado valiosas indicações de plantas com propriedades medicinais, utilizadas para diversas enfermidades, tais como resfriados, bronquites, úlceras, diarreias e tumores como fonte de novos agentes antineoplásicos.

Os produtos naturais têm sido uma importante fonte de novos agentes antineoplásicos. Existem, no mínimo, 250.000 espécies de plantas no mundo, sendo que mais de 1.000 plantas apresentam propriedades antitumorais significantes<sup>31</sup>. Justificando o aumento da busca em todo o mundo de novas terapias, mais eficientes, oriundas de fitoterápicos.

Tendo em vista que a maioria dos tratamentos atualmente disponíveis, como radioterapia e quimioterapia, utilizadas como primeira escolha para o tratamento do câncer, apresentam sérios efeitos adversos como inibição da resposta imunológica e a mielossupressão, visto que não apresentam toxicidade seletiva, é necessário buscar novas drogas com efeitos mais específicos e menor toxicidade<sup>32</sup>.

A avaliação da atividade de extratos e frações de plantas medicinais poderá levar à identificação e ao isolamento de novas substâncias com potencial aplicação na terapêutica humana contra o câncer. O Brasil, por possuir uma riqueza inestimável, representada pela biodiversidade de sua flora, aparece como



um importante centro na busca de novos fármacos derivados de plantas medicinais encontradas em nosso território<sup>27</sup>.

Dentre essa variedade destacamos a *Jodina rhombifolia* Hook.et Arn., popularmente conhecida como “cancorosa de três pontas”, “erva cancorosa”, “cancrosa”, “cancerosa” e “sombra de touro”, é uma espécie da família *Santalacea* largamente empregada na medicina caseira para o tratamento de úlceras crônicas, carcinomas, problemas estomacais, resfriados e outras afecções<sup>33,34,35</sup>.

É uma planta nativa do Sul do Brasil, localizada principalmente na Mata de Pinhais de Santa Catarina e na depressão central do Rio Grande do Sul, mas também pode ser encontrada no Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai. Atualmente, encontra-se em perigo de extinção, principalmente, pelo consumo indiscriminado de suas folhas para fins terapêuticos<sup>34, 36</sup>.

Os principais componentes químicos identificados nas folhas de *J. rhombifolia* são: ácidos orgânicos, compostos fenólicos, alcalóides, taninos, flavanóides, grupos amino, esteróides, gomas e mucilágenos. Experimentos realizados comprovam a presença de ácidos graxos nas sementes<sup>37, 38</sup>. Outros experimentos evidenciaram esteróides e ou triterpenos em grande quantidade nesta planta, sendo também encontrados, em menor proporção, alcalóides, cumarinas e saponinas em extrato etanólico<sup>39</sup>.

Estudo realizado com o extrato aquoso da planta revelou que este extrato não apresenta atividade mutagênica contra *Salmonella*<sup>40</sup>.

Beira (2000) evidenciou atividade citotóxica de extratos desta planta em linhagens de Adenocarcinoma de mama (MCF-7), Adenocarcinoma de cólon (HT-29), Adenocarcinoma de pâncreas (Bx-PC3, PANC-1)<sup>41</sup>.

Destacaremos também a *Carapa guianensis* Aubl. popularmente conhecida como “andiroba”, “andirova”, “angirova”, “carapa”, “carapinha” e “purga-de-danto-inácio”, é uma espécie da família *Meliaceae*, nativa da região Amazônica, que se localiza na própria Bacia da Amazônia e região do norte do Pará até o sul da Bahia, além de algumas localidades da América Central, Antilhas e África Tropical. Esta planta apresenta uma larga aplicação na

medicina popular, dentre as quais se destaca sua ação analgésica, antiinflamatória, antiartrítica, antitumoral, larvicida e antimicrobiana<sup>42, 43, 34, 44, 45,46</sup>.

Os componentes químicos do óleo das sementes de *C. guianensis* são representados por estearinas e ácidos graxos, dentre eles, os ácidos oléico, mirístico e linoléico<sup>34</sup>. Além disso, o extrato hexânico deste óleo revela a presença de taninos com comprovada atividade antimicrobiana, carboidratos, alcalóides e glicosídeos<sup>43</sup>. O extrato metanólico do mesmo revelou a presença de limonóides, que são substâncias também conhecidas como meliacinas ou tetranorterpenóides, os quais apresentam propriedades fago-inibitórias e inseticidas<sup>47, 48,45</sup>. Em análise química do extrato etanólico do óleo da semente também revelou a presença de alguns compostos fenólicos<sup>49</sup>.

No extrato aquoso foi identificada a presença de limonóides (tetranortriterpenóides), responsável pelas propriedades repelentes de insetos<sup>48</sup>. Três destes limonóides (onimbolide, epoxiazadiradiona e azadirachtin) foram testados sobre células em cultura de neuroblastoma de ratos e osteosarcoma humano, demonstrando atividade citotóxica com Concentração Inibitória 50% (CI<sub>50</sub>)<sup>30</sup>.

Nas folhas estão presentes ésteres graxos saturados derivados de ácidos e álcoois de cadeias longas<sup>50</sup>.

Experimentos realizados com flores de *C. guianensis*, que foram submetidas à hidrodestilação, revelaram a presença de biciclogermacrano (23%) e germacrano B (14,3%)<sup>51</sup>. Também são reportados, na literatura, outros componentes químicos ativos encontrados, como carapinas e epoxiazadiradionas<sup>52</sup>.

Não há informações sobre seu uso em linhagens neoplásicas de origem sanguínea.

## **2- JUSTIFICATIVA**

A leucemia mielóide aguda constitui uma entidade clínica potencialmente curável, de diagnóstico elaborado, tratamento oneroso e intensivo. A leucemia prómielocítica corresponde de 5 a 10% das leucemias mielóides agudas e ocorre com mais frequência em pacientes relativamente jovens, com uma média de idade de 30 a 38 anos. Apresenta uma manifestação clínica típica, ocorrendo sangramentos secundários à coagulação intravascular disseminada em 90% dos casos, o que dificulta o tratamento e aumenta as taxas de mortalidade relacionadas à doença.

Os linfomas são a neoplasia hematológica mais freqüente, atinge principalmente as faixas etárias da população mais suscetível, que são os jovens e os idosos, fazendo com que o tratamento seja dificultado e, aumentando os riscos da doença, não só das complicações, como de futuras seqüelas, como por exemplo, infertilidade.

A resistência aos quimioterápicos é um dos grandes motivos de falhas no tratamento, com isso torna-se necessário a busca de novos fármacos visando um sinergismo de tratamentos, com menos riscos ao portador. É necessário identificar, avaliar e desenvolver novos e mais efetivos agentes terapêuticos para o tratamento das neoplasias.

### 3 - PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS

Uma proporção importante de fármacos antitumorais atualmente utilizados em clínica são produtos naturais derivados de plantas, bactérias, fungos e animais. A utilização por S. Farber em 1954 de um antibiótico extraído do cultivo de uma espécie de *Streptomyces*, a actinomicina D, para tratar um paciente com tumor de Wilms metastático, introduziu no tratamento do câncer o primeiro fármaco antineoplásico derivado de produtos naturais, despertando grande interesse no meio científico nessa área de pesquisa, o qual perdura até hoje<sup>27</sup>.

A identificação de agentes farmacológicos naturais com ação antineoplásica segue basicamente três perspectivas: (1) o conhecimento prévio da existência da interação do composto químico antiproliferativo com determinado tipo de câncer, e, conseguinte, identificação da planta que o possua; (2) a modificação de fármacos já existentes, visando alguma melhoria na capacidade curativa e (3) o rastreamento ao acaso de produtos naturais dos quais não se conhece o efeito sobre células cancerígenas (*screening*)<sup>27</sup>.

Qualquer planta está sujeita ao *screening* ao acaso e pode ter seus constituintes químicos testados e, dentre estes, identificar-se um ou mais apresentando ação anticancerígena. Porém, a probabilidade disto ocorrer aumenta à medida que se busca algum conhecimento a respeito da planta a ser testada. A medicina popular é fonte de informações acerca da possível presença de fármacos viáveis ao experimento.

## 4 - OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiproliferativa de extratos das folhas da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn e, do óleo da semente da *Carapa guianensis* Aubl. em cultivo “*in vitro*” nas seguintes linhagens celulares: (HL-60) de Leucemia Mielóide Aguda, Linfoma Daudi e (NIH-3T3) de Fibroblasto murino.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Determinar a  $CI_{50}$ : concentração do extrato inibitória capaz de reduzir 50% o crescimento celular nos cultivos controle durante o período de incubação com o fitoterápico;
- Determinar a CIT: concentração do extrato que causa uma inibição total do crescimento celular.

## 5 - HIPÓTESES

As plantas medicinais *Jodina rhombifolia* (“cancorosa de 3 pontas”) e *Carapa guianensis* (“ andiroba”) apresentam atividade citotóxica, com inibição da proliferação e morte celular, frente a linhagem de células tumorais de Leucemia Mielóide Aguda HL-60 e Linfoma Daudi e não será observada morte celular na linhagem de células fibroblásticas ( NIH - 3T3) *in vitro* .

## 6 - MATERIAS E MÉTODOS

### 6.1. Materiais

#### 6.1.1. Plantas Medicinais

- *Jodina rhombifolia*: foram utilizadas as folhas da planta das quais foram extraídos os extratos metanólico e aquoso (Figura 1);

- *Carapa guianensis*: foi utilizado o óleo das sementes da planta do qual foram extraídos os extratos metanólico e éter de petróleo (Figura 2).

O material utilizado no estudo foi preparado e fornecido pelo Laboratório de Oleoquímica do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de Pelotas – UFPel, pela Prof. Maria Regina Alves Rodrigues.



**Figura 1. Planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn**

Fonte: [arn.org.ar/Alec Earnshaw](http://arn.org.ar/Alec%20Earnshaw)



**Figura 2. Planta e sementes da *Carapa guianensis* Aubl**

Fonte: WWW.carapa.org

## **6.1.2. Linhagens Celulares**

### **6.1.2.1. Linhagem de Leucemia Mielóide Aguda (HL-60)**

É uma linhagem de leucemia aguda, mieloblástica, humana, que proliferam em suspensão, mantidas em estufa de cultura a temperatura de 37°C, em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com SBF a 20%, com crescimento exponencial de  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  células/mL a um tempo de duplicação de 12-14 horas. Esta linhagem celular foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro/RJ/Brasil (BCRJ).

### **6.1.2.2. Linhagem de Linfoma Daudi**

É uma linhagem derivada de Linfoma de Burkitt, humana, que proliferam em suspensão, mantidas em estufa de cultura a temperatura de 37°C, em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com SBF a 20%, com crescimento exponencial de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células/mL a um tempo de duplicação de 12-14 horas. Esta linhagem celular foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro/RJ/Brasil (BCRJ).



### **6.1.2.3. Linhagem de Fibroblastos (NIH-3T3)**

É uma linhagem murina, não neoplásica, utilizada como controle para atividade de citotoxicidade específica dos ensaios testados. Prolifera em monocamada aderida a superfície do frasco de cultivo (25cm<sup>2</sup>, poliestireno, Corning), formando pequenos grumos celulares, mantida em estufa de cultura a temperatura de 37°C, em meio de cultivo DMEM, suplementado com SBF a 10%. Esta linhagem celular foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro/RJ/Brasil (BCRJ). Esta linhagem foi utilizada como controle não neoplásico, por já estar sendo utilizada no laboratório de cultivo celular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel /RS), fazendo parte de um projeto maior, sob o patrocínio do CNPQ, onde os experimentos foram realizados e também para que os resultados obtidos pudessem ser comparados, aos anteriormente testados.

### **6.1.3. Meio de Cultivo**

#### **6.1.3.1. Meio RPMI 1640**

Meio utilizado para cultivo *in vitro* das células de Leucemia Mielóide Aguda HL-60 e Linfoma Daudi; para realização dos ensaios biológicos de citotoxicidade dos extratos da planta *J. rhombifolia* e *C. guianensis*. Este meio utiliza um sistema de tamponamento com bicarbonato e concentrações modificadas de aminoácidos essenciais e vitaminas para estimular o crescimento celular.

O meio RPMI 1640 comercial (frasco de 100 mL, Cultilab<sup>®</sup>) é líquido, estéril, de cor rosa forte e contém 0,2% de bicarbonato de sódio, glutamina e antibiótico (100 U.mL de penicilina e 0,1 mg /mL de estreptomicina). Este meio foi conservado em alíquotas de 100 mL a 4°C.

O meio foi suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) a 20%.

### **6.1.3.2. Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco–(DMEM)**

Meio utilizado para cultivo *in vitro* das células de fibroblastos (NIH-3T3) e para realização dos ensaios biológicos de citotoxicidade dos extratos da planta *J. rhombifolia* e *C. guianensis*. É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos essenciais, vitaminas e outros componentes (glicose, piruvato de sódio e vermelho de fenol). Age como uma solução nutritiva para o crescimento celular.

O meio DMEM (Gibco) foi preparado pelo Laboratório de Virologia do Departamento de Veterinária preventiva da Universidade Federal de Pelotas, a partir da forma em pó. Para sua utilização foi acrescido de antibióticos e antifúngicos (penicilina/estreptomicina, Baytril<sup>®</sup>, Fungison<sup>®</sup>), esterilizado por filtragem em membrana apropriada, e conservado em alíquotas a 4°C. Para o repique celular, o meio foi suplementado com SBF a 10%.

### **6.1.4. Soro Bovino Fetal (SBF)**

Este soro foi utilizado a 10% como suplemento do meio de cultivo DMEN (Gibco) para o crescimento em monocamada da linhagem de fibroblastos (NIH-3T3) e a 20% como suplemento do meio de cultivo RPMI 1640 para o crescimento em suspensão da Linhagem (HL-60) e Linfoma Daudi.

O soro bovino fetal comercial (frasco de 100 mL, Cultilab<sup>®</sup>) é líquido, estéril, de cor amarelo claro e contém albumina, globulina alpha 1 e 2, globulina β, glicose, uréia, creatina, e lemo globulina. Segundo Barker (2002), ele é indicado para cultivos celulares fornecendo os fatores de crescimento e os nutrientes necessários<sup>47</sup>.

O SBF foi conservado em alíquotas de 100 mL a -20°C. Para sua utilização as alíquotas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C e distribuídas em volumes menores, segundo as necessidades do trabalho e para evitar possível contaminação.

## **6.1.5. Soluções**

### **6.1.5.1. Solução Tampão de Fosfato (PBS)**

Foi utilizada como meio de lavagem no cultivo de células que crescem em monocamada em cultivo *in vitro*. Esta solução é livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , e contém NaCl(137mM), KCl (2,7mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (10mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e água MilliQ e o pH desta solução foi ajustado em 7,4. A solução foi esterilizada em autoclave e conservada a 4°C.

### **6.1.5.2. Solução de Tripsina-EDTA**

A solução tripsina-EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético) foi utilizada para permitir o deslocamento das células dos frascos de cultivo e/ou agregação de grumos celulares, através da sua propriedade proteolítica sobre as proteínas intercelulares.

Esta solução contém PBS, Tripsina (Inlab) e EDTA (Synth). O pH foi ajustado em 7,2 e foi esterilizado por filtração com membranas de 0,4 $\mu\text{m}$  de diâmetro (Millipore) e a conservação das alíquotas foi à temperatura de -20°C. Somente a alíquota de trabalho foi mantida a 4°C.

### **6.1.5.3. Solução de Sulforodamina B (SRB)**

A solução a 0,4% p/v de sulforodamina B (Sigma), utilizada para a determinação colorimétrica da citotoxicidade *in vitro*, foi preparada dissolvendo a SRB em ácido acético a 1%. A solução foi preparada no momento de sua utilização.

### **6.1.5.4. Solução Tampão Tris Base**

Para preparar a solução a 10mM, foi dissolvido 1,21g de Tris base comercial (Vetec<sup>®</sup>) em 1 litro de água MilliQ. O pH foi ajustado a 10,5 com NaOH. Esta solução foi utilizada para resolubilizar a solução de SRB e foi conservada em temperatura ambiente, sem luz e calor.

#### **6.1.5.5. Ácido Tricloacético 50% (p/v) TCA**

Para preparar esta solução, foi pesado 50g de ácido tricloroacético comercial (Vetec<sup>®</sup>) e foi dissolvido em 100 mL de água MilliQ. Esta solução foi utilizada para romper as células e fixar as proteínas celulares e foi conservada a 4°C.

#### **6.1.5.6. Ácido Tricloacético 80% (p/v) TCA**

Foi pesado 80g de ácido tricloroacético comercial (Vetec<sup>®</sup>) e dissolvido em 100mL de água MilliQ. Foi utilizada em células de Leucemia Mielóide Aguda (HL-60) e Linfoma Daudi, que crescem em suspensão e foram conservadas a 4°C até o momento da utilização.

#### **6.1.5.7. Ácido Acético 1%**

Para preparar esta solução, foi dissolvido 10 mL de ácido acético (Synth) em 990 mL de água MilliQ. Esta solução foi utilizada para remover o excesso da solução de SRB e foi conservada em temperatura ambiente, sem luz e calor.

#### **6.1.5.8. Corante Azul de Trypan 0,4%**

Esta solução foi preparada utilizando NaCl 0,81% K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 0,06% e azul de trypan comercial. Estas substâncias foram dissolvidas em 100 mL de água MilliQ, filtradas com membranas de 28µm de diâmetro (Prolab) e a conservação das alíquotas foi a 4°C. Este corante foi utilizado para corar as células mortas, diferenciando-as das células vivas, para contagem da viabilidade celular em Câmara de Neubauer.

#### **6.1.5.9. Dimetilsulfoxido (DMSO)**

O DMSO é usado na medicina como solvente por apresentar baixa toxicidade, age como criopreservante em concentração de 5%. Foi utilizado para dissolver o extrato do óleo da *Carapa guianensis*.

### 6.1.6. Equipamentos

- Capela fluxo Laminar (Gabinete de Bio-Segurança Purifier<sup>®</sup> 36210-xx)
- Incubador (Incubadora Teknal TE-399)
- Autoclave
- Microscópio Invertido (Quimis<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brasil)
- Banho-maria
- Centrífuga refrigerada
- Bomba de Aspiração
- Refrigerador (-8°C, -20°C, -180°C)
- Câmara de Nitrogênio líquido
- Estufa de secagem
- Equipamento de filtração
- Lavador de pipetas automático
- Destilador
- Moinho Fritsch

## 6.2. MÉTODOS

### 6.2.1. Delineamento

Estudo experimental, pré-clínico, *in vitro*

- Linhagens celulares: HL-60, Linfoma Daudi e NIH-3T3
- Plantas medicinais: *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. e *Carapa guianensis* Aubl.

## 6.2.2. Preparo dos extratos

### 6.2.2.1. Preparo dos Extratos da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

#### - *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

A coleta da planta foi realizada no município de Pelotas, RS, Brasil, no mês de dezembro de 2005. A planta foi levada para o Departamento de Química Orgânica UFPel e depositado um exemplar no herbário com número de identificação 20.737. A secagem foi realizada à temperatura ambiente durante dois meses. Após este período, a planta foi fragmentada, separando-se as folhas dos troncos. As folhas foram trituradas em moinho (Fritsch) de malha 0,5mm, na velocidade de 1200 rpm, e o pó obtido foi acondicionado até o momento da preparação dos extratos (aquoso e metanólico) para realização dos ensaios biológicos.

- Obtenção dos extratos metanólico e aquoso de *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.

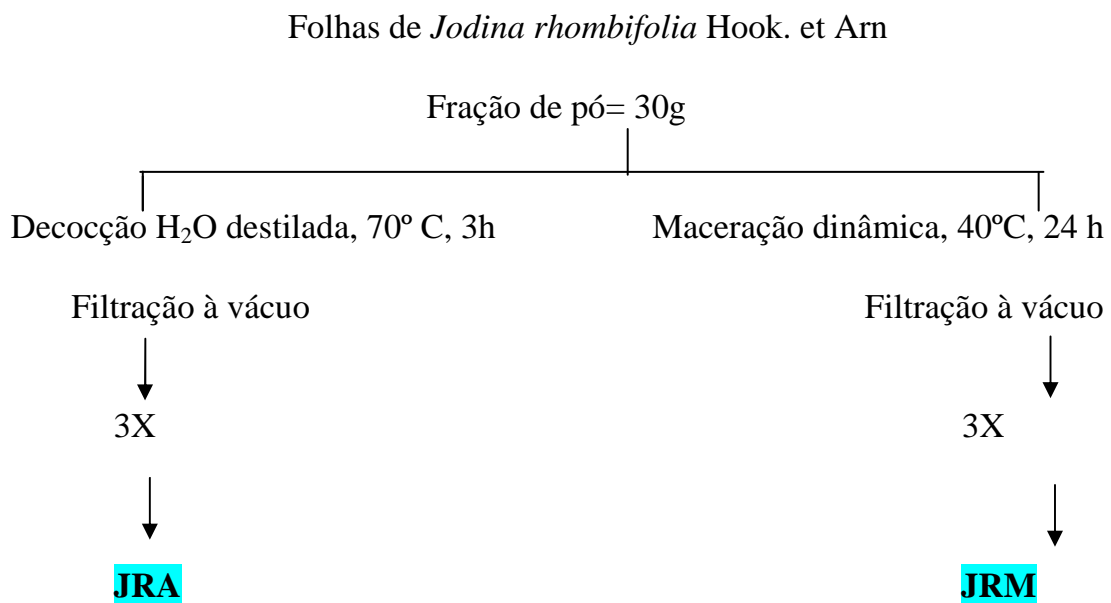
Foi utilizado 30g de pó da biomassa vegetal resultante da moagem das folhas secas de *J. rhombifolia* foram utilizados tanto para extração aquosa quanto para metanólica e o volume final utilizado de extrator (metanol P.A. ou água destilada) para ambas as extrações foi de 900mL.

A extração aquosa foi realizada por decocção, à temperatura de 70°C, por 3h. Acrescenta-se ao pó da biomassa vegetal 300 mL de extrator. Depois de realizada a filtração, um novo volume de 300 mL do extrator foi adicionado ao resíduo, num total de três vezes. Após o período de 9h, o volume final de extrato aquoso obtido (**JRA**) (aproximadamente 900 mL), foi congelado a -83°C para posterior liofilização (Figura 3).

A extração metanólica foi feita por maceração dinâmica, à temperatura de 40°C e uma duração total de aproximadamente 72h. Durante cada período de 24h, o pó vegetal de folhas secas moídas foi extraído com 300 mL de extrator. A cada 24h, o resíduo foi decantado e, posteriormente, filtrado e um novo volume

de 300 mL de extrator utilizado foi adicionado para nova maceração. Após o período de 72h, o volume total do extrato metanólico (**JRM**) foi reunido e concentrado primeiramente em aparelho evaporador rotatório e depois, o restante de metanol, foi retirado através de bomba a vácuo (Figura 3).

Também foi determinado o teor de umidade do pó das folhas secas de *J. rhombifolia* utilizadas para extração.



**Figura 3:** Esquema de preparação dos extratos aquoso (**JRA**) e metanólico (**JRM**) da *Jodina rhombifolia*.

### 6.2.2.2. Preparo dos Extratos da planta *Carapa guianensis* Aubl.

O material utilizado no estudo foi o óleo essencial das sementes da planta *C. guianensis*. Os extratos obtidos deste óleo foram preparados e fornecidos pelo Laboratório de Oleoquímica do Departamento de Química Orgânica da UFPel.

- Preparo dos extratos da planta *C. guianensis*

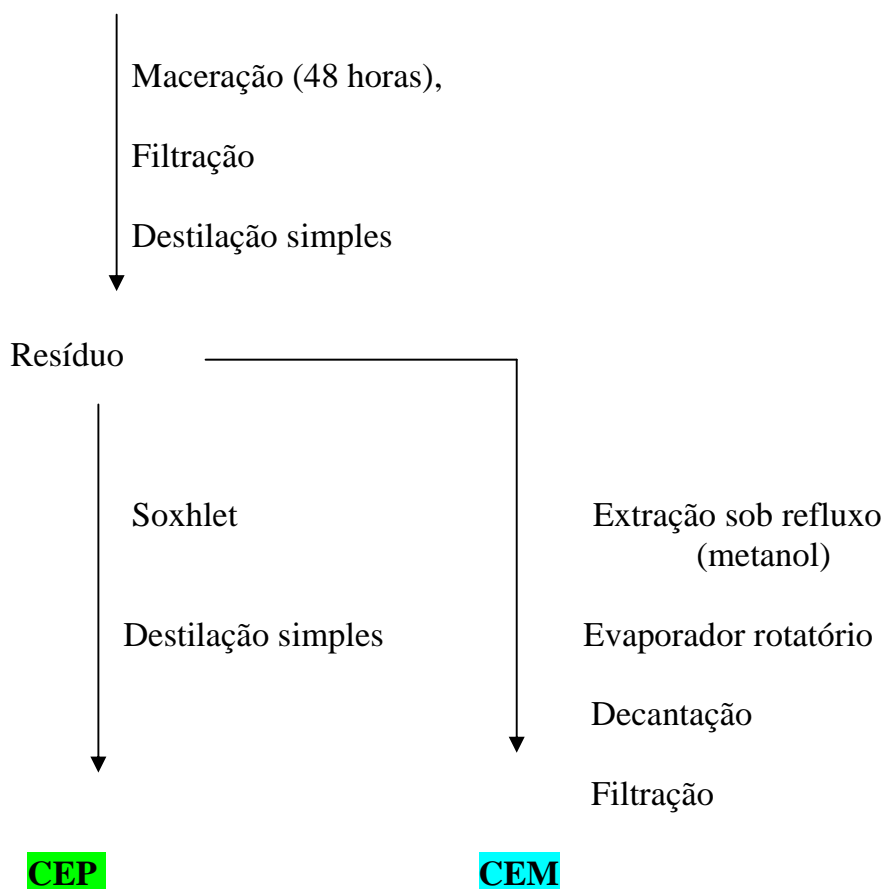
Os extratos obtidos dos óleos das sementes desta planta foram preparados segundo Ollis (1970) e fornecidos pelo Laboratório de Oleoquímica do Departamento de Química Orgânica da UFPel<sup>48</sup>.

As sementes foram moídas e submetidas à extração por maceração, por 2 dias, em éter de petróleo (Figura 4). Depois, foi realizada filtração a vácuo do extrato e este foi concentrado por destilação simples. Após esta etapa, o resíduo foi submetido à extração no Soxhlet com éter de petróleo, para remover as gorduras residuais. Para isto, cerca de 120g do resíduo foram submetidas a extrações sucessivas de 4h (5x) e os extratos foram concentrados por destilação simples. Desta forma, foi obtido o extrato de éter de petróleo (**CEP**).

Algumas amostras retiradas dos extratos de Soxhlet foram secas, pesadas e submetidas à extração com solvente metanol sob refluxo por 4h (5x). O solvente foi concentrado no evaporador rotatório à temperatura ambiente. Por decantação, foi obtido um precipitado que foi recuperado sob filtração a vácuo e, após seco, resultou em um pó levemente amarelado. O extrato resultante que teve um aspecto oleoso escuro foi denominado de óleo-resina. Este, após um período de cerca de 3 dias, formou uma película que depois se precipitou, formando uma massa sólida compacta, resultando no extrato metanólico (**CEM**)(Figura 4).



Sementes de *Carapa guianensis* Aubl.



**Figura 4:** Esquema de preparação dos extratos de éter de petróleo (CEP) e metanólico (CEM) utilizado pelo Laboratório de Oleoquímica (DQO-UFPEl) das sementes de *Carapa guianensis*.

### 6.2.2.3. Solubilização dos extratos para os testes de citotoxicidade

Os extratos obtidos foram dissolvidos em água ultrapura e dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec) de acordo com a sua solubilidade<sup>54</sup>. Depois de esterilizados por filtração, em filtro de membrana microbiológico de 0,22 $\mu$ m de diâmetro (TPP), foram preparadas, cinco diluições (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 $\mu$ g/mL).

As concentrações finais testadas em cada cavidade foram determinadas de acordo com os resultados obtidos no *screening* inicial. A concentração final do DMSO nas cavidades foi inferior a 1% (v/v) para não interferir na viabilidade ou

proliferação celular. As soluções dos extratos a serem testados foram conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da sua utilização.

### **6.2.3. Técnica de Cultivo Celular**

#### **- Manutenção das linhagens celulares:**

- **Cultivo em suspensão de HL-60 e Linfoma Daudi**

Os requisitos para seleção de uma linhagem celular para teste em placas de microcultivo são: (a) adaptação a crescimento em meio simples de RPMI- 1640 mais 5% SBF e glutamina 2mM; (b) teste negativo para micoplasma e produção de anticorpo de rato; (c) perfis de isoenzima e cariótipo verificando a origem humana das células; (d) tempo de duplicação da massa que permita a coleta de aproximadamente  $3 \times 10^7$  células, duas vezes em uma semana, e (e) empregabilidade em ensaios de microcultivo<sup>29</sup>.

As células da linhagem HL60 e Linfoma Daudi foram cultivadas em suspensão, em meio de cultura RPMI-1640, suplementada com 20% de SBF, em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  (Incubadora Teknal TE-399) a  $37^{\circ}\text{C}$ , com crescimento exponencial de  $5 \times 10^5$  e um tempo de duplicação de 12 a 14 horas, estocadas em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . As células foram repicadas a cada 72h e, o acompanhamento do crescimento celular foi feito a cada 24 horas, utilizando-se um microscópio óptico invertido (Quimis<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brasil).

Toda a manipulação das células ocorreu em capela de fluxo laminar (Gabinete de BIO-Segurança Purifier<sup>®</sup> 36210-xx). Os subcultivos foram realizados quando a densidade celular atingiu mais de 80% de confluência.

O número de células foi calculado em função do tempo de duplicação de cada linhagem celular.

A partir de um crescimento exponencial inicial, inoculou-se em garrafas de cultivo (25 ou 75  $\text{cm}^2$ , poliestireno, TPP) o número de células necessárias para que o cultivo estivesse em crescimento exponencial em dois dias.

O cultivo celular ou repique foi realizado conforme o seguinte protocolo:

- 1- Transfere-se para novos frascos, um volume da suspensão celular de acordo com o número de células contadas por Hemocitômetro (Depth 0,100 mm);
- 2- Adiciona-se, aos volumes transferidos, meio de cultura acrescido de 20% de SBF e incuba-se em estufa de CO<sub>2</sub>;
- 3- Este processo foi realizado duas vezes, de acordo com confluência dos frascos em cultivo.

- **Cultivos em monocamada de NIH-3T3:**

As células de linhagem NIH-3T3 (fibroblastos) crescem aderidas em monocamada, em cultivo com meio DMEM, suplementado com 10% de SBF, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A manutenção da linhagem foi realizada mediante transferência do cultivo duas vezes por semana, sendo estocadas em nitrogênio líquido a -196°C.

O número de células foi calculado em função do tempo de duplicação de cada linhagem celular.

A partir de um crescimento exponencial inicial, inoculou-se em garrafas de cultivo (25 ou 75 cm<sup>2</sup>, poliestireno, TPP) o número de células necessárias para que o cultivo estivesse em crescimento exponencial em dois dias.

O cultivo celular ou repique foi realizado conforme o seguinte protocolo:

- 1- Aspira-se o meio de cultivo do frasco que continha as células em crescimento exponencial, adiciona-se 2 mL de PBS para lavagem das células;
- 2- Elimina-se o PBS por aspiração, adiciona-se 1 mL de solução de Tripsina-EDTA (tripsina 0,25% e EDTA 1mM). As células são encubadas durante 6 minutos a temperatura ambiente e 1 minuto a 37°C;
- 3- Adiciona-se 5mL de meio de cultivo acrescido de 10% de SBF para neutralizar o efeito de enzima;
- 4- Os grumos celulares são desagregados mediante pipetagem suave e realiza-se a transferência para novos frascos de cultivo.

A densidade celular foi determinada em Hemocitômetro.

#### 6.2.4. Contagem Celular

Para manutenção das linhagens celulares é necessário avaliar a viabilidade celular e determinar o número de células a serem inoculadas, o que foi obtido através do método da exclusão de células coradas pelo azul de Trypan.

O protocolo de contagem foi feito da seguinte forma: o meio de cultivo da garrafa foi aspirado e, após realizou-se a lavagem com PBS e tripsinização como anteriormente citado. Procedeu-se à neutralização da tripsina com meio suplementado com soro e o volume presente na garrafa foi colocado em um tubo Falcon<sup>®</sup>, e centrifugado a 1000rpm, por 5 minutos. Após foi descartado o sobrenadante do Falcon<sup>®</sup> e acrescentou-se 5 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF sobre pellet, ressuspensando-o. Em um eppendorf foi colocado 20µL dessa solução e 20µL de Corante Azul de Trypan a 0,4% que penetra a membrana de células mortas corando-as, totalizando 40µL. Foi colocado 20µL desta solução em um Hemacitômetro, chamado de Câmara de Neubauer, levado ao microscópio invertido (Quimis<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brasil) realizando-se a contagem da viabilidade celular (O Método semi-quantitativo), segundo Freshney (2005). Foram contados cinco quadrantes da Câmara<sup>31</sup>. A seguinte fórmula foi utilizada:

$$NC = NCV \times 10^4$$

Onde: NC = Número de células presentes na garrafa;

NCV = Média aritmética do número de células contadas em cinco quadrantes;

$10^4$  = Conversão para 1 mL da suspensão celular

### **6.2.5. Avaliação atividade citotóxica:**

Os testes de citotoxicidade dos extratos vegetais (JRA, JRM, CEP e CEM) em diferentes concentrações (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL) foram testados sobre as linhagens tumorais: Leucemia Mielóide Aguda (HL-60) e Linfoma Daudi, e sobre a linhagem não tumoral controle de fibroblastos (NIH-3T3). As linhagens celulares foram cultivadas em placas de microculturas, e foram incubadas nas cinco diferentes concentrações dos extratos, por um período de 72 horas, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e 37° C de temperatura. Para determinar o crescimento ou a morte das células tratadas e não tratadas, foi realizada leitura das placas em espectrofotômetro a 492 nm. Com os resultados obtidos a partir das concentrações testadas de cada extrato, foi gerada uma curva dose-resposta, através do software estatístico GraphPad Prism 5.00. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes, realizados em quaduplicada, conforme demonstrado no esquema abaixo:

**Placa T0** - Controle de crescimento celular das linhagens testadas no Tempo Zero.

Placa T0: Meios de cultura (MC) + células: HL-60, Linfoma Daudi e NIH-3T3, como demonstrado Figura 5

**Placa Teste** - Testes de citotoxicidade dos extratos vegetais em diferentes concentrações sobre células HL-60, Linfoma Daudi e NIH-3T3 (controle) após 72 horas de incubação.

Placa Teste: Meios de cultura (MC) + HL-60 + extratos

Meios de cultura (MC) + Linfoma Daudi + extratos

Meios de cultura (MC) + NIH-3T3 + extratos


- **Testes de Citotoxicidade celular em células HL-60, Linfoma Daudi e NIH-3T3**

Os experimentos foram dispostos em placas de microcultura com 96 cavidades de acordo com o esquema representado pelas Figuras 5 e 6. Cada linhagem foi testada em placa individual, para evitar possíveis contaminações durante a manipulação das células. O esquema abaixo ilustra a disposição das placas nos experimentos com a linhagem celular HL-60. O esquema representado abaixo foi o mesmo utilizado também para as Linhagens de Linfoma Daudi e Fibroblastos e para os extratos da planta *Carapa guianensis* Aubl. (CEP e CEM).

**Placa T<sub>0</sub> - HL-60**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	HL60							MC	MC			
D	HL60							+	+			
E	HL60							SFB	SFB			
F	HL60											
G												
H												

 T<sub>0</sub> = MC + SBF + células de HL60;

 Branco = MC + SBF

**FIGURA 5:** Representação esquemática do teste da atividade citotóxica em placa Tempo Zero T<sub>0</sub> de ELISA<sup>®</sup> para células HL-60.

**Placa Teste:** Teste de citotoxicidade com diferentes concentrações do extrato vegetal - *Jodina rhombifolia* (JRA) e (JRM) sobre células HL-60 – *Screening*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	JRA	JRA	JRA	JRA	JRA			JRM	JRM	JRM	JRM	JRM
D	JRA	JRA	JRA	JRA	JRA			JRM	JRM	JRM	JRM	JRM
E	JRA	JRA	JRA	JRA	JRA			JRM	JRM	JRM	JRM	JRM
F	JRA	JRA	JRA	JRA	JRA			JRM	JRM	JRM	JRM	JRM
G												
H												

- Brancos Linha A, B, G e H, Coluna 1-5 = MC + SBF+ [ ]\* extratos JRA  
 Brancos Linha A, B, G e H, Coluna 6 = MC + SBF + solvente (H<sub>2</sub>O)  
 Brancos Linha A, B, G e H, Coluna 7 = MC + SBF + solvente (DMSO)  
 Brancos Linha A, B, G e H, Coluna 8-12 = MC+ SBF + [ ]\* extratos JRM  
 \* Diferentes concentrações dos extratos testados

■ Controle para JRA - 198µl MC + SBF + Células (HL-60) + 2µl solvente (DMSO)

■ Controle para JRM - 198µl MC + SBF + Células (HL-60) + 2µl solvente (DMSO)

■ Teste com linhagem tumoral: MC + SBF + Células (HL-60) + cinco diferentes concentrações do extrato (JRA)

■ Teste com linhagem tumoral: MC + SBF + Células (HL-60) + cinco diferentes concentrações do extrato (JRM)

As colunas representam as diferentes concentrações dos extratos testados (*J. rhombifolia*) e (*C. guianensis*) e as linhas serão as repetições de cada concentração testada:

Coluna 1/8 = 2 µg/mL

Coluna 2/9 = 10 µg/mL

Coluna 3/10 = 60 µg/mL

Coluna 4/11 = 100 µg/mL

Coluna 5/12 = 600 µg/mL

**Figura 6:** Representação esquemática do teste da atividade citotóxica em placa de testes ELISA® das diferentes concentrações dos extratos *Jodina rhombifolia* (JRA) e (JRM) e *Carapa guianensis* (CEP) e (CEM) e controles sobre células HL-60 – *screening*.

### 6.2.6. Ensaios colorimétricos

- **Testes de avaliação da atividade citotóxica dos extratos nos cultivos celulares**

A citotoxicidade em culturas de células é um ensaio inicial bastante utilizado, cujos resultados apresentam limitações e, não podem ser de imediato extrapolados para as condições clínicas em seres humanos. Este teste pode ser desenvolvido através de uma variedade de metodologias. Fornece resultados rápidos e consistentes com atividade biológica e muitas vezes diminuem a necessidade de testes em animais de laboratório<sup>55</sup>. As vantagens dos testes de citotoxicidade são o controle das condições experimentais, o baixo custo, os resultados rápidos e as questões bioéticas. As suas desvantagens são o fato do ensaio não conseguir simular as condições *in vivo* e a dificuldade em extrapolar os resultados obtidos.

Duas técnicas colorimétricas rotineiramente utilizadas para análise do efeito de fármacos no crescimento celular são o ensaio de microcultivo baseado na redução metabólica do sal tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio brometo] (MTT) a cristais de formazan, por aquelas células que permaneceram viáveis depois da exposição e incubação com o líquido ou material testado. A outra se refere ao corante de proteína ligante Sulforodamina B (SRB), cujo mecanismo baseia-se no conteúdo total protéico de células que não foram mortas até o final do ensaio<sup>56</sup>. A ligação da SRB é estequiométrica, e a quantidade de corante extraído de células pigmentadas é diretamente proporcional a massa total de proteína e, portanto, correlacionada com o número de células<sup>57, 58</sup>. Ambos os métodos apresentam o mesmo desempenho quando nas mesmas condições experimentais; contudo, o último apresenta vantagens técnicas no que diz respeito à sua aplicação em larga escala, sendo adotado de forma rotineira pelo NCI (*National Cancer Institute*) em avaliações antitumorais *in vitro*<sup>59</sup>.



Dependendo da concentração do extrato testado e da sua toxicidade, as células cultivadas poderão ter seu metabolismo inibido (efeito citostático, atividade antiproliferativa) ou mesmo morte celular.

Neste estudo, os perfis de citotoxicidade dos extratos foram realizados pelo método da Sulforodamina B (SRB). Os perfis completos da dose-resposta também permitirão a determinação da concentração tóxica que reduz o crescimento celular para 50% (CI<sub>50</sub>).

Depois da contagem, diluições das suspensões celulares foram realizadas a fim de se obter uma densidade de células apropriada para inoculação de cada linhagem celular dentro de cada cavidade das placas de microcultivo.

As linhagens celulares foram cultivadas na densidade de  $4 \times 10^4$  (período T<sub>0</sub>), seguido por 72 horas de incubação com os diferentes extratos<sup>29</sup>.

Foram utilizadas, no mínimo, duas placas de microcultivo com 96 cavidades, para cada linhagem, por ensaio. Uma das placas foi utilizada para análise, uma vez corada, da densidade óptica (DO) correspondente ao número de células de partida (T<sub>0</sub>). A placa chamada de tempo zero continha várias cavidades com réplicas de suspensão celular (200µl) e réplicas contendo 200µL de meio RPMI 1640 + 10% SBF que serviram de reativo branco para os valores de T<sub>0</sub>. A outra placa foi utilizada para realização dos testes com os extratos.

Na placa para testes, as células foram cultivadas em 198µL de meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de SBF, a 37°C e 100% de umidade relativa do ar em estufa de CO<sub>2</sub>, acrescida dos extratos das plantas (2 µL) em teste.

As placas com as células foram expostas a 2µL de cada uma das concentrações crescentes dos extratos por 72 horas e comparadas a um grupo controle, onde as células foram tratadas com meio acrescido de solvente (água ou DMSO). Foram realizadas de três a cinco réplicas para cada concentração do extrato (T) e, cultivos controles paralelos que continham células e o excipiente do produto (água ou DMSO). Também foram preparadas réplicas das cavidades sem células (brancos), que continham 198µL de meio de cultivo e SBF e 2µL das concentrações do extrato.

- **Técnica com Sulforodamina B**

Após a incubação do cultivo no tempo desejado para o teste de citotoxicidade, as células foram fixadas mediante a adição de 50µL de ácido tricloroacético (TCA) (50% para a linhagem que cresce aderida e a 80% para as linhagens que crescem em suspensão), aos 200µL de cultivo em cada cavidade (concentração final de 10% de TCA em cada cavidade) e incubadas em refrigerador a 4°C durante 1 hora. Em seguida, foi descartado o meio de cultivo (sobrenadante) de cada cavidade e foram realizadas 5 lavagens com 200µL de água destilada deionizada por cavidade. Depois disso, as placas foram secas, à temperatura ambiente. Uma vez secas as placas, foram coradas ou conservadas tampadas a 4°C até o momento da coloração.

O ensaio colorimétrico foi realizado mediante adição de 100µL de uma solução de Sulforodamina B 0,4% p/v (com ácido acético 1%) em cada cavidade dos controles e testes. A placa mantida em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente e depois eliminada a solução não fixada mediante cinco lavagens com ácido acético a 1%. O sobrenadante de cada lavagem foi eliminado mediante a inversão brusca das placas e, uma vez vazias, foram deixadas secar em temperatura ambiente. Após o corante fixado nas proteínas celulares foi ressolubilizado com 100µL de solução tampão Tris Base 10 mM (pH 10.0), sob agitação giratória de um agitador de placas (“Shaker”) numa velocidade de 50rpm, à temperatura ambiente e durante um período de 5 minutos<sup>56,59</sup>. Foi feita a leitura da densidade óptica com aparelho espectrofotômetro num comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 492 nm, considerando-se válidas aquelas que estiverem na margem de 1.5 a 2.0 unidades de densidade óptica<sup>54,59</sup>.

### 6.2.7. Cálculo dos parâmetros de Citotoxicidade Celular

Foram calculadas as médias dos testes, dos controles e da placa tempo zero das distintas réplicas realizadas em cada condição experimental. Desta forma foram obtidos 3 valores para cada caso:

- $T_0$  refere-se à densidade óptica (DO) correspondente ao número de células em cultivo a tempo zero;
- C refere-se à DO correspondente aos cultivos controle que cresceram na presença de excipiente (água ou DMSO) na ausência de extrato ou fração;
- T refere-se à DO correspondente às cavidades que continham as diferentes concentrações dos extratos testados.

Segundo Monks (1991), a medida da viabilidade e sobrevivência celular após o cultivo na presença dos produtos a avaliar foi expressa como  $\%T/C[(DO \text{ de células tratadas}) / DO \text{ do controle celular}] \times 100$ . Utilizando estas medidas, a resposta celular foi calculada nos termos de: estimulação do crescimento, ausência do efeito do extrato, inibição do crescimento, morte celular e proliferação celular<sup>29</sup>.

Se  $T \geq T_0$ , os resultados foram calculados segundo a seguinte fórmula:

$$\%T/C = (T - T_0) / (C - T_0) \times 100$$

Se  $T < T_0$ , significa que o produto causa morte celular e os resultados foram calculados com a fórmula:

$$\%T/C = (T - T_0) / T_0 \times 100$$

Desta forma, foram originadas curvas dose/resposta para cada extrato e a partir delas foram calculados 2 níveis de efeito:

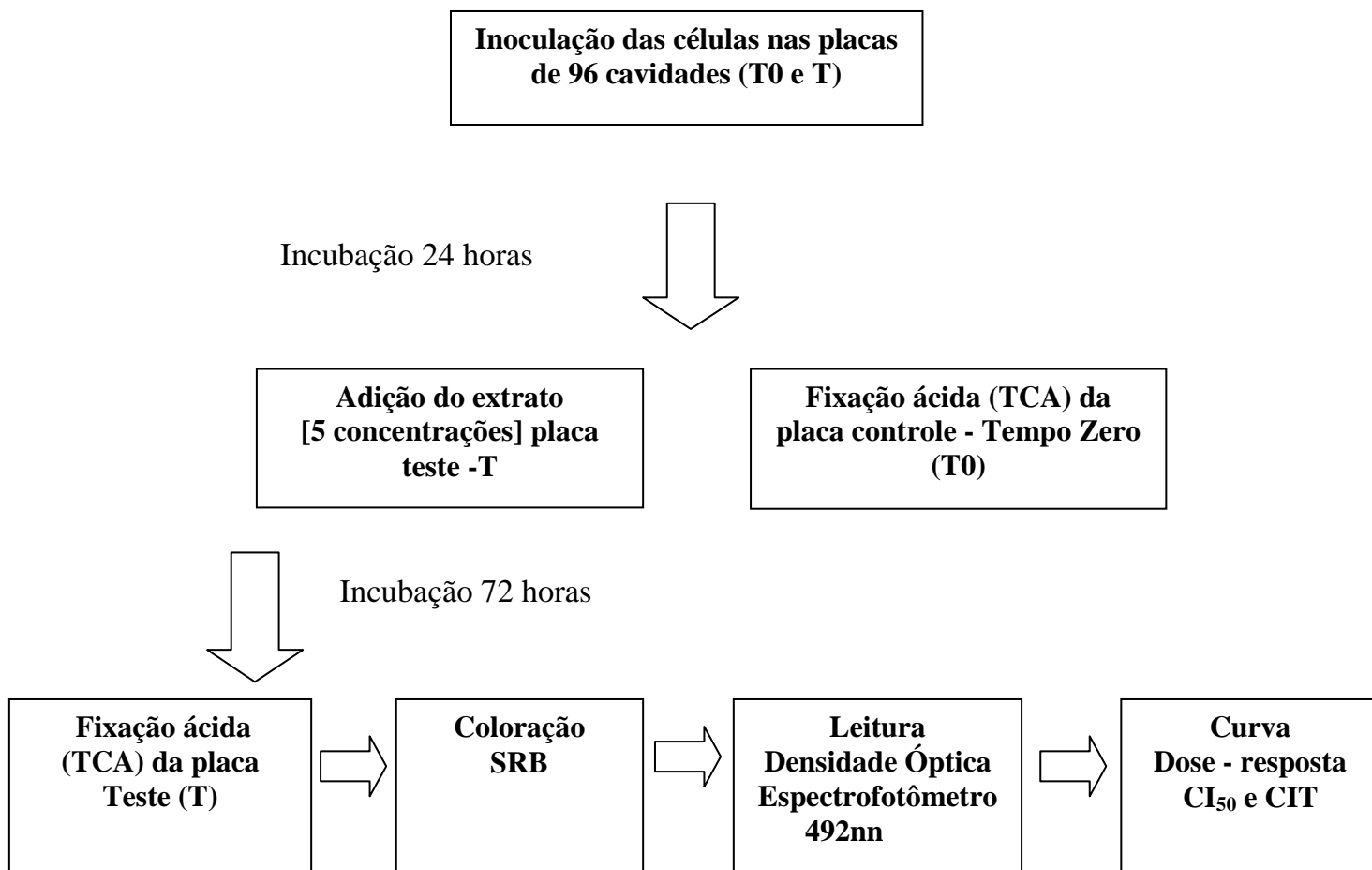
- $CI_{50}$ , concentração do extrato inibitória capaz de reduzir 50% o crescimento celular nos cultivos controle durante o período de incubação com o fitoterápico;
- CIT, concentração do extrato que causa uma inibição total do crescimento celular, quando a quantidade de proteína presente na cavidade ao final do tempo de incubação é igual à existente no tempo de adição do produto;

Os resultados estão representados graficamente relacionando a porcentagem de crescimento da célula no eixo das ordenadas com a concentração de substância utilizada no eixo das abscissas. O valor 100% é o controle das células sem tratamento e o valor zero é o controle de células no início do experimento, quando são adicionadas as substâncias testes. Nas figuras e tabelas os resultados inferiores a 100% de crescimento e superiores a 0% são considerados como inibição de crescimento (atividade citostática). Já os resultados abaixo de zero significam que ocorreu morte celular (atividade citocida).

#### **6.2.8. Análise Estatística**

Os resultados da análise de atividade citotóxica, obtidos através de leitura em espectrofotômetro, foram tabulados e analisados com o software estatístico GraphPad Prism versão 5.00 para Windows. Com os resultados obtidos a partir das concentrações testadas de cada extrato, foi avaliada a taxa de proliferação e morte celular ao longo dos dias de teste e foi gerada uma curva dose-resposta. Para análise estatística dos resultados, usou-se o programa SPSS13.0. O teste utilizado foi a regressão linear para as diferentes concentrações para cada extrato. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 6.2.9. Fluxograma com o resumo do método utilizado para ensaio da atividade antiproliferativa dos extratos testados



### 6.3. Aspectos Éticos

Este estudo trata-se de um estudo experimental, pré-clínico, fase 0, tendo sido aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança da UFPel (CBIO), local onde foi desenvolvido.

## 7. Resultados

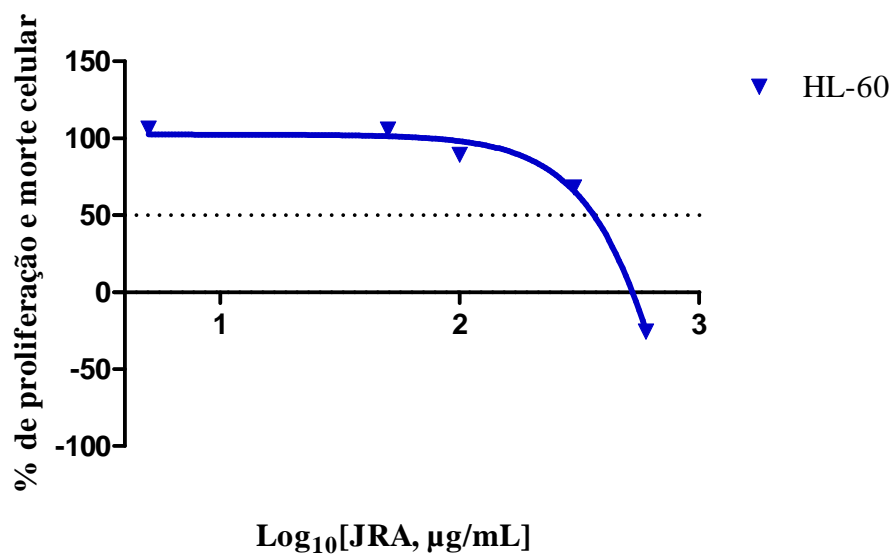
### 7.1. Atividade inibitória sobre a linhagem de Leucemia Mielóide Aguda-HL-60

- A atividade citotóxica sobre a linhagem HL-60 com concentrações crescentes do extrato aquoso (**JRA**) da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL) está demonstrada na Tabela 1 com as médias da porcentagem de proliferação e morte celular da linhagem avaliada, nas diferentes concentrações do extrato testadas, em relação ao controle. Estes resultados para a linhagem HL-60 estão apresentados sob a forma de curva dose-resposta, ilustrada na Figura 7. Como pode ser observado, o extrato apresentou atividade citotóxica, ocorrendo morte celular comparado ao controle e  $CI_{50} = 363,9$  µg/mL e  $CIT = 529,6$  µg/mL. Houve significância estatística em teste de regressão linear ( $p < 0.05$ ) (conforme Tabela 2).
- A atividade inibitória da proliferação sobre a linhagem HL-60 com concentrações crescentes (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL) do extrato metanólico (**JRM**) da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn, pode ser observada na Tabela 1 e a curva dose-resposta obtida com os resultados pode ser demonstrada na Figura 8. O extrato apresentou atividade citotóxica, ocorrendo morte celular, comparado ao controle e  $CI_{50} = 28,1$  µg/mL e  $CIT = 424,6$  µg/mL, houve significância estatística ( $p < 0.05$ ) demonstrado na Tabela 2.

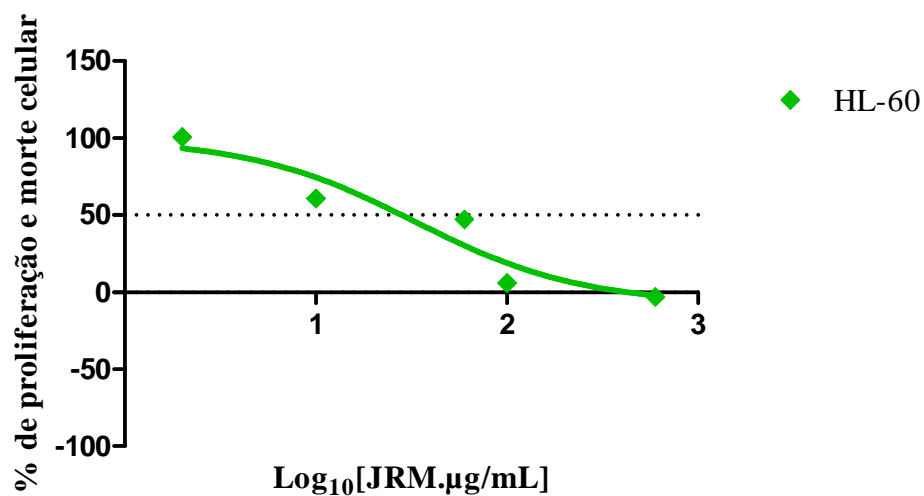
- Os resultados obtidos com concentrações crescentes (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato de éter de petróleo (**CEP**) da *Carapa guianensis* Aubl. sobre a linhagem HL-60, pode ser observado na Tabela 1 e a representação como curva dose-resposta na Figura 9. A atividade citotóxica demonstra a ocorrência de inibição da proliferação celular ( $p < 0.05$ ), comparado ao controle, porém a  $CI_{50}$  e CIT não foram obtidas com as concentrações testadas (provavelmente sejam superiores a 600  $\mu\text{g/mL}$ ), necessitando a realização de novos experimentos com concentrações mais elevadas, o que pode ser demonstrado na Tabela 2.
- Face os resultados obtidos da atividade citotóxica sobre a linhagem HL-60, com concentrações crescentes (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato metanólico (**CEM**) da *Carapa guianensis* Aubl. podemos observar que o extrato apresentou atividade citotóxica, ocorrendo morte celular, houve significância estatística em teste de regressão linear ( $p < 0.05$ ) (Tabela 1 e Figura 10), com valores para  $CI_{50} = 12,6 \mu\text{g/mL}$  e  $CIT = 80,5 \mu\text{g/mL}$ , como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 1.** Médias da porcentagem da proliferação e morte celular da linhagem HL-60 mediante exposição de 72h aos extratos testados (JRA, JRM, CEP e CEM), nas diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões em relação ao controle.

HL-60				
Extratos	JRA % proliferação e morte celular	JRM % proliferação e morte celular	CEP % proliferação celular	CEM % proliferação e morte celular
Concentração 1 [2 $\mu\text{g/mL}$ ]	106, 141 $\pm 6.04$	100, 557 $\pm 32.09$	103, 164 $\pm 44.78$	74, 612 $\pm 37.49$
Concentração 2 [10 $\mu\text{g/mL}$ ]	105, 461 $\pm 0.74$	60, 856 $\pm 42.340$	75, 684 $\pm 26.56$	51, 893 $\pm 31.43$
Concentração 3 [60 $\mu\text{g/mL}$ ]	89, 295 $\pm 6.75$	47, 268 $\pm 59.01$	75, 839 $\pm 25.83$	16, 351 $\pm 21.14$
Concentração 4 [100 $\mu\text{g/mL}$ ]	68, 011 $\pm 4.77$	5, 875 $\pm 47.97$	60, 325 $\pm 31.59$	- 13, 961 $\pm 16.34$
Concentração 5 [600 $\mu\text{g/mL}$ ]	-25, 640 $\pm 0.43$	-3, 102 $\pm 37.99$	54, 004 $\pm 57.56$	-27, 985 $\pm 4.75$
Controle T	109, 986 $\pm 0.01$	111, 061 $\pm 0.92$	107, 070 $\pm 0.07$	100, 297 $\pm 0.29$

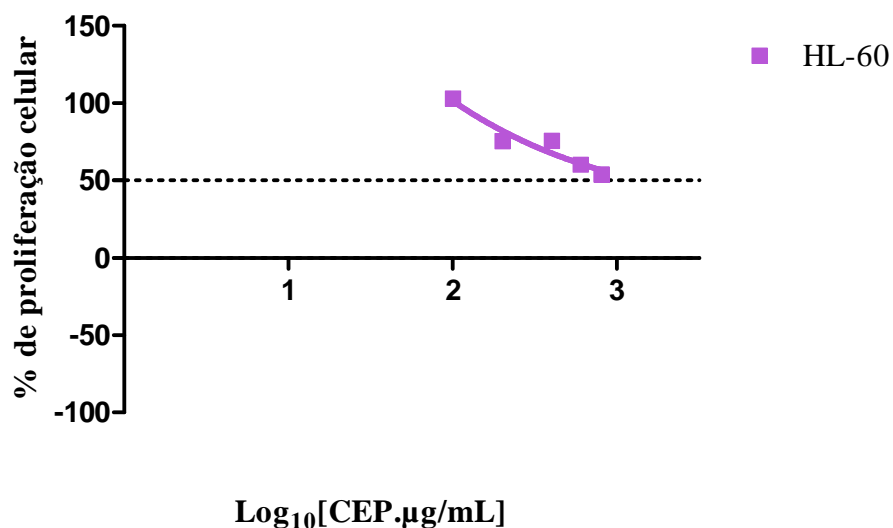


**Figura 7.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato aquoso da *Jodina rhombifolia* (JRA), sobre a linhagem HL-60, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média das porcentagens de proliferação e morte celular obtidas em cada concentração.

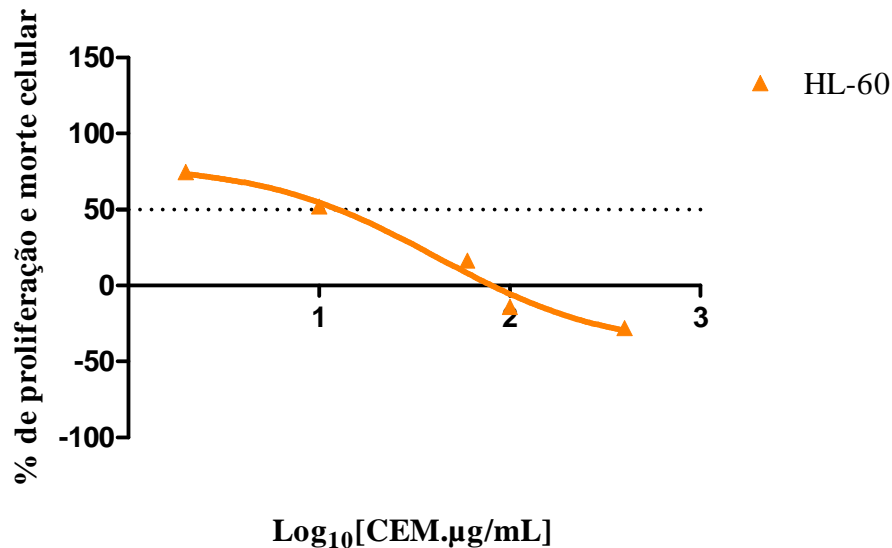


**Figura 8.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato metanólico da *Jodina rhombifolia* (JRM), sobre a linhagem HL-60, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média da porcentagem de proliferação e morte celular obtidas em cada concentração.





**Figura 9.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato éter de petróleo da *Carapa guianensis* (CEP), sobre a linhagem HL-60, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média da porcentagem de proliferação celular obtidas em cada concentração.



**Figura 10.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato metanólico da *Carapa guianensis* (CEM), sobre a linhagem HL-60, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média da porcentagem de proliferação e morte celular obtidas em cada concentração.

**Tabela 2.** Resultados dos valores de  $CI_{50}^*$  e  $CIT^*$  obtidos dos extratos de *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem HL-60.

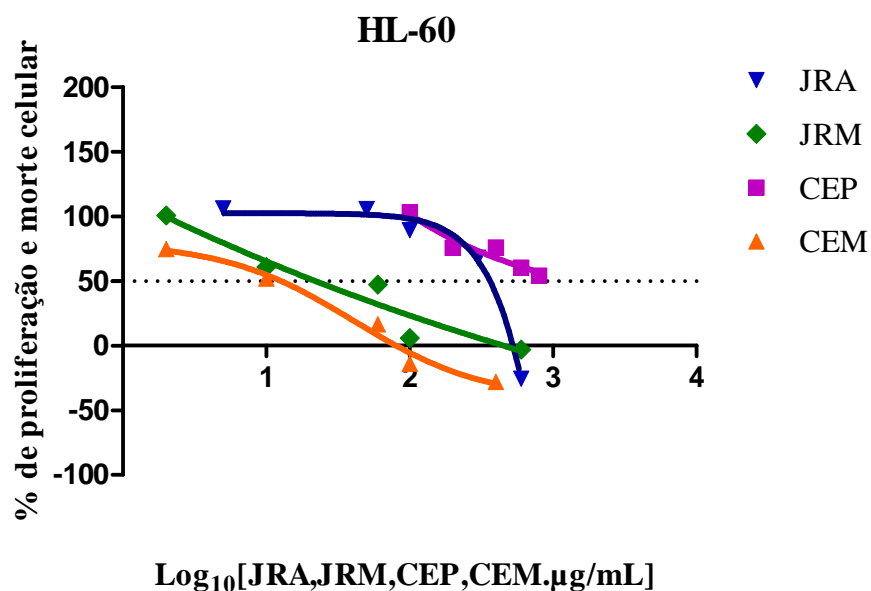
EXTRATOS	LINHAGEM CELULAR- HL-60	
	$CI_{50}^{**}$	$CIT^{**}$
JRA	363,9 $\mu\text{g/mL}$	529,6 $\mu\text{g/mL}$
JRM	28,1 $\mu\text{g/mL}$	424,6 $\mu\text{g/mL}$
CEP	ND	ND
CEM	12,6 $\mu\text{g/mL}$	80,5 $\mu\text{g/mL}$

\* Determinado pelo ensaio de SRB; \*\* valores de  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50% do crescimento celular) e  $CIT$  (concentração que inibe 100% do crescimento celular) determinado por regressão não-linear da concentração versus porcentagem de inibição obtida em cada experimento.

ND resultado não detectado nas concentrações testadas

## 7.2. Comparação da atividade citotóxica de todos os extratos sobre a linhagem HL-60

A Figura 10 demonstra comparativamente a atividade dos diferentes extratos testados sobre a linhagem estudada (HL-60), e os resultados obtidos apresentaram uma citotoxicidade diferenciada entre os extratos, demonstrando uma maior atividade com os extratos metanólicos (JRM e CEM).



**Figura 11.** Atividade citotóxica dos extratos aquoso e metanólico da *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e dos extratos de éter de petróleo e metanólico da *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem HL-60.

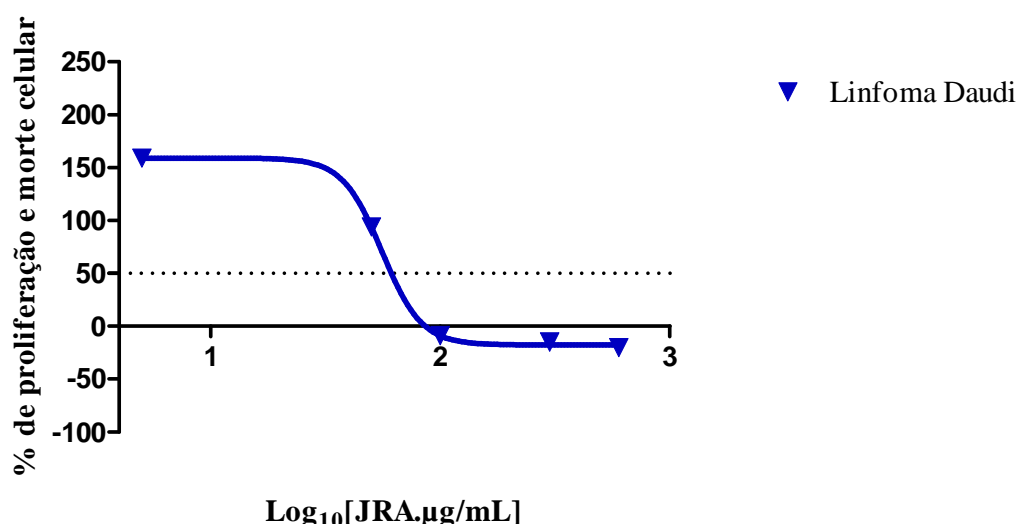
### 7.3. Atividade inibitória sobre a linhagem Linfoma Daudi

- A atividade citotóxica sobre a linhagem de Linfoma Daudi com concentrações crescentes do extrato aquoso (**JRA**) da *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL) está demonstrada na Tabela 3 com as médias da porcentagem de proliferação celular da linhagem avaliada em relação ao controle, nas diferentes concentrações do extrato testadas. Estes resultados estão apresentados sob a forma de curva dose-resposta, ilustrada na Figura 12. Como pode ser observado, o extrato apresentou atividade citotóxica, ocorrendo inibição da proliferação celular, comparado ao controle, com significância estatística em teste de regressão linear ( $p < 0.05$ ). Os valores encontrados para a  $CI_{50}$  e CIT foram 41,09 µg/mL e 55,90 µg/mL, respectivamente (Tabela 4).
- Com relação ao extrato metanólico (**JRM**) da planta *Jodina rhombifolia* Hook et Arn., nas diferentes concentrações testadas (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL), foi observado inibição da proliferação celular e morte celular, com significância estatística ( $p < 0.05$ ). Esta atividade citotóxica pode ser verificada na Tabela 3 e a curva dose-resposta correspondente, esta demonstrada na Figura 13. Foram obtidos valores de  $CI_{50} = 49,31$  µg/mL e  $CIT = 262,92$  µg/mL, conforme Tabela 4.
- Os resultados obtidos com o extrato de éter de petróleo (**CEP**) da planta *Carapa guianensis* Aubl., nas diferentes concentrações testadas (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL), sobre a linhagem do Linfoma Daudi, pode ser observado na tabela 3. O extrato provocou inibição da proliferação e morte celular, com  $CI_{50}$  de 53,18 µg/mL e CIT de 457,65 µg/mL, com significância estatística ( $p < 0.05$ ) (Tabela 4). A curva dose-resposta obtida com estes resultados esta representada na Figura 14.
- A atividade inibitória do extrato metanólico (**CEM**) da planta *Carapa guianensis* Aubl., sobre a linhagem testada, nas diferentes concentrações (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL), apresentou inibição da proliferação celular, porém não apresentou morte celular, apesar disso houve significância na comparação com os controles ( $p < 0.05$ ), conforme Tabela 3. A curva dose-

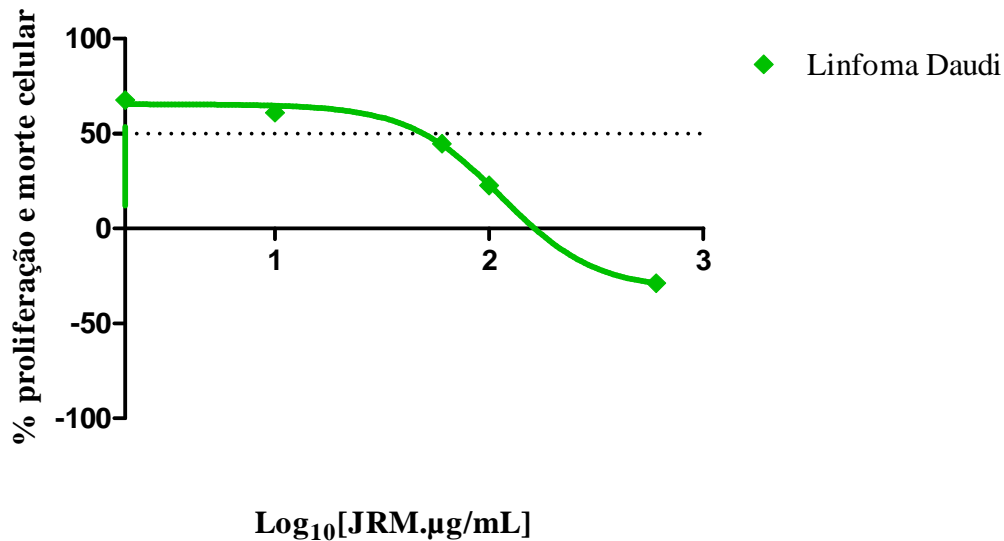
resposta obtida, pode ser observada na Figura 15. Este extrato apresentou  $CI_{50} = 146,21 \mu\text{g/mL}$  e CIT não foi obtida com as concentrações testadas, provavelmente seja superior a maior concentração testada ( $600 \mu\text{g/mL}$ ), conforme Tabela 4.

**Tabela 3.** Médias da porcentagem de proliferação e morte celular da linhagem de Linfoma Daudi, mediante exposição de 72h aos extratos testados (**JRA, JRM, CEP e CEM**), nas cinco diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões em relação ao controle.

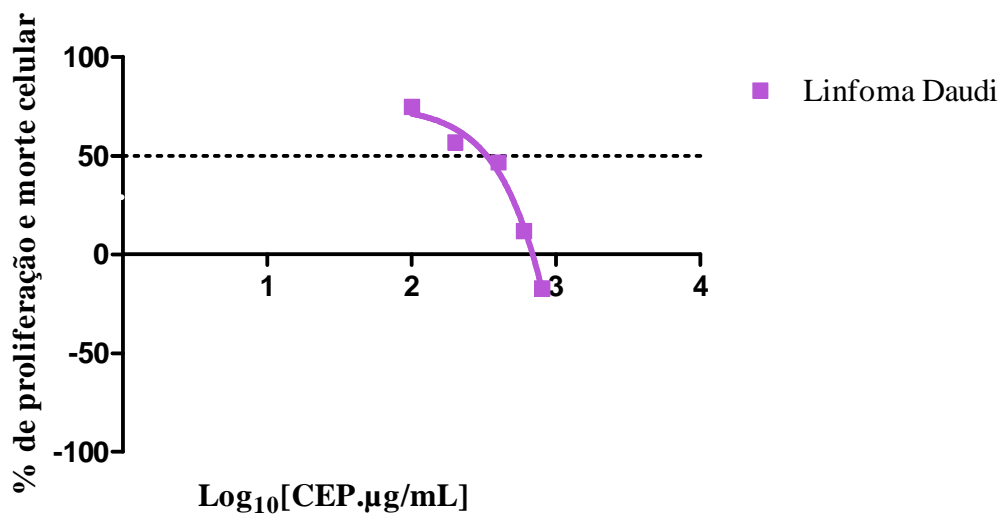
LINFOMA DAUDI				
Extratos	JRA % proliferação e morte celular	JRM % proliferação e morte celular	CEP % proliferação e morte celular	CEM % proliferação celular
Concentração 1 [2 $\mu\text{g/mL}$ ]	158, 821 $\pm 39.14$	67, 714 $\pm 5.79$	74, 826 $\pm 14.43$	87, 711 $\pm 12.56$
Concentração 2 [10 $\mu\text{g/mL}$ ]	94, 054 $\pm 22.88$	61, 105 $\pm 5.93$	56, 927 $\pm 9.13$	81, 593 $\pm 17.24$
Concentração 3 [60 $\mu\text{g/mL}$ ]	- 9, 013 $\pm 32.20$	44, 724 $\pm 11.63$	46, 688 $\pm 4.56$	67, 202 $\pm 13.80$
Concentração 4 [100 $\mu\text{g/mL}$ ]	-14, 960 $\pm 28.26$	22, 752 $\pm 14.88$	11, 857 $\pm 7.93$	56, 904 $\pm 11.29$
Concentração 5 [600 $\mu\text{g/mL}$ ]	-20, 192 $\pm 38.26$	-28, 767 $\pm 15.30$	-17, 006 $\pm 1.77$	23, 796 $\pm 2.84$
Controle T	136, 011 $\pm 32.17$	105, 281 $\pm 5.70$	100, 796 $\pm 0.93$	99, 616 $\pm 0.60$



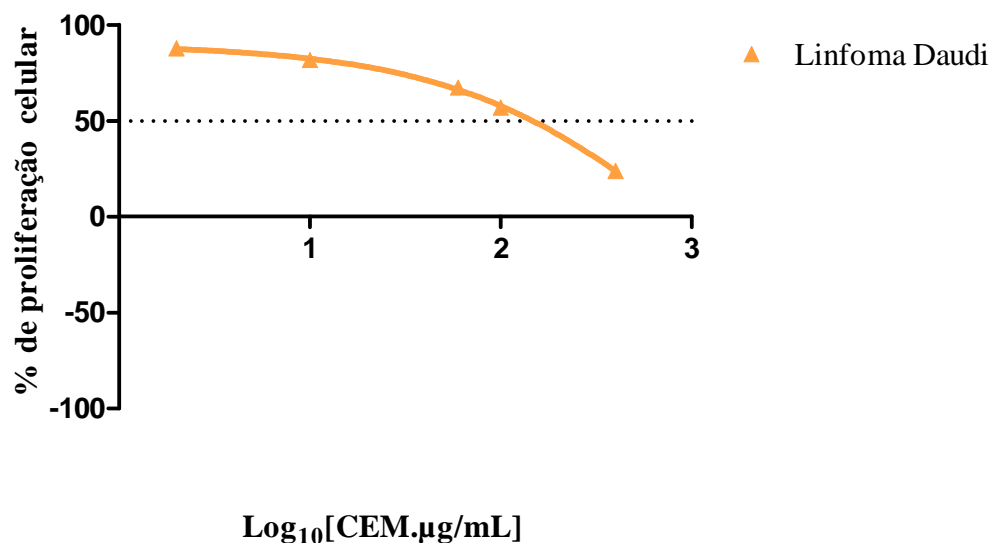
**Figura 12.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato aquoso da *Jodina rhombifolia* (JRA), sobre a linhagem Linfoma Daudi, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média das porcentagens de proliferação e morte celular obtidas em cada concentração.



**Figura 13.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato metanólico da *Jodina rhombifolia* (JRM), sobre a linhagem Linfoma Daudi, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média da porcentagem de proliferação e morte celular obtidas em cada concentração.



**Figura 14.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato de éter de petróleo da *Carapa guianensis* (CEP), sobre a linhagem Linfoma Daudi, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média da porcentagem de proliferação celular e morte celular obtidas em cada concentração.



**Figura 15.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato metanólico da *Carapa guianensis* (CEM), sobre a linhagem Linfoma Daudi, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média da porcentagem de proliferação celular obtidas em cada concentração.

**Tabela 4.** Resultados dos valores de CI<sub>50</sub>\* e CIT\* obtidos dos extratos de *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem Linfoma Daudi.

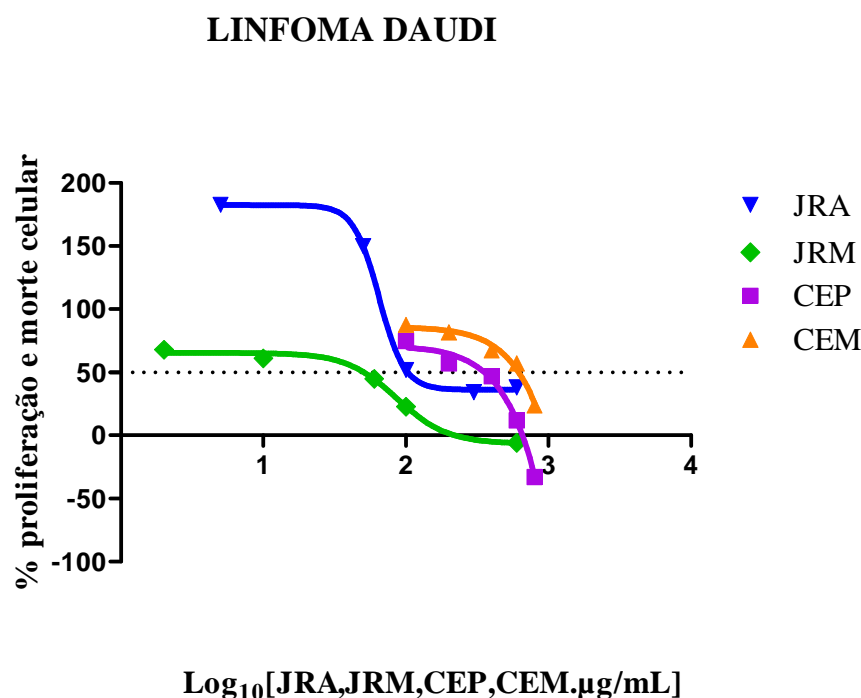
EXTRATOS	LINHAGEM CELULAR - LINFOMA DAUDI	
	CI <sub>50</sub> **	CIT**
JRA	41,09 µg/mL	55,90 µg/mL
JRM	49,31 µg/mL	262,92 µg/mL
CEP	53,18 µg/mL	457,65 µg/mL
CEM	146,21 µg/mL	ND

\* Determinado pelo ensaio de SRB; \*\* valores de CI<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% do crescimento celular) e CIT (concentração que inibe 100% do crescimento celular) determinado por regressão não-linear da concentração versus porcentagem de inibição obtida em cada experimento.  
ND resultado não detectado nas concentrações testadas

#### 7.4. Comparação da atividade citotóxica de todos os extratos sobre a linhagem Linfoma Daudi.

A Figura 16 demonstra comparativamente a atividade dos diferentes extratos testados sobre a linhagem estudada de Linfoma Daudi, e os resultados obtidos apresentaram uma citotoxicidade diferenciada entre os extratos, demonstrando uma maior atividade com os extratos aquoso e metanólico da

*Jodina rhombifolia* et Arn. (**JRA e JRM**) e pelo extrato de éter de petróleo da planta *Carapa guianensis* Aub. (**CEP**).



**Figura 16.** Atividade citotóxica dos extratos aquoso e metanólico da *Jodina rhombifolia* (**JRA** e **JRM**) e dos extratos de éter de petróleo e metanólico da *Carapa guianensis* (**CEP** e **CEM**) sobre a linhagem Linfoma Daudi.

### 7.5. Atividade inibitória sobre a linhagem Controle de Fibroblastos-NIH-3T3

- Os resultados obtidos com os extratos aquoso e metanólico da planta *Jodina rhombifolia* et Arn. (**JRA e JRM**) e pelo extrato de éter de petróleo e metanólico da planta *Carapa guianensis* Aub. (**CEP e CEM**), nas diferentes concentrações testadas (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL) sobre a linhagem não neoplásica e controle de Fibroblastos-NIH-3T3, pode ser demonstrado na Tabela 5, onde observamos as médias da porcentagem de proliferação celular obtidas. Podemos observar que o extrato que obteve maior atividade citotóxica foi o **CEM**, que provocou diminuição da proliferação celular com uma  $CI_{50} = 7,94 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 6). Entretanto esse efeito não foi proporcional para as concentrações mais elevadas, onde não houve acréscimo do efeito deste extrato, não havendo

significância estatística ( $p>0.05$ ). A atividade citotóxica obtida está demonstrada na Figura 20, onde observamos que apesar da resposta inicial este extrato não obteve CIT e também não ocorreu morte celular.

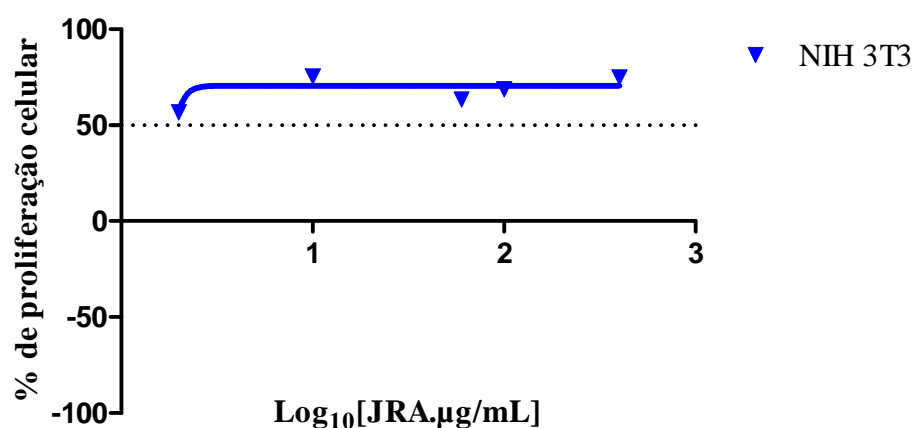
- O extrato aquoso (**JRA**) apresentou atividade citotóxica, como observamos na Tabela 5, em relação ao controle, porém não atingiu  $CI_{50}$  e CIT (Tabela 6) e a concentração que provocou maior efeito sobre as células foi a menor delas ( $2 \mu\text{g/mL}$ ). Com a exposição as demais concentrações a linhagem celular apresentou menor efeito e permaneceu estável. Neste extrato os resultados não demonstraram significância estatística entre as diferentes concentrações ( $p>0.05$ ) Isto pode ser observada na Figura 17, onde a atividade citotóxica avaliada não obteve curva dose-resposta com o extrato.
- O extrato de Éter de petróleo (**CEP**) apresentou menor efeito sobre os fibroblastos, comparado ao controle e ao extrato **CEM** (Tabela 5). Apresentou atividade citotóxica, porém não atingiu  $CI_{50}$ , CIT e morte celular, mesmo com a concentração mais elevada ( $600 \mu\text{g/mL}$ ) ( $p>0.05$ ) como podemos observar na Figura 19 e Tabela 6.
- O extrato metanólico da planta *Jodina rhombifolia* et Arn. (**JRM**) foi o que apresentou menor efeito sobre a linhagem de fibroblastos (Tabela 5), não obteve  $CI_{50}$  e CIT e manteve a proliferação celular em torno de 60%, em relação ao controle inicial ( $p>0.05$ ) (Tabelas 5 e 6). Esta atividade pode ser observada na Figura 18.
- Como podemos observar os extratos metanólicos (**JRM e CEM**) tiveram atividade citotóxica distinta sobre os fibroblastos (Tabela 5). Os resultados entre os extratos das duas plantas demonstram que os extratos da planta *Jodina rhombifolia* et Arn. (**JRA e JRM**) não obtiveram  $CI_{50}$  e CIT, assim como o extrato etérico da planta *Carapa guianensis* Aubl. (**CEP**). Apenas o extrato metanólico da planta *Carapa guianensis* Aubl. (**CEM**) obteve  $CI_{50}$ , mas também não obteve CIT, nas concentrações testadas (Tabela 6 e Figura 21). A diferença entre as concentrações testadas para todos os



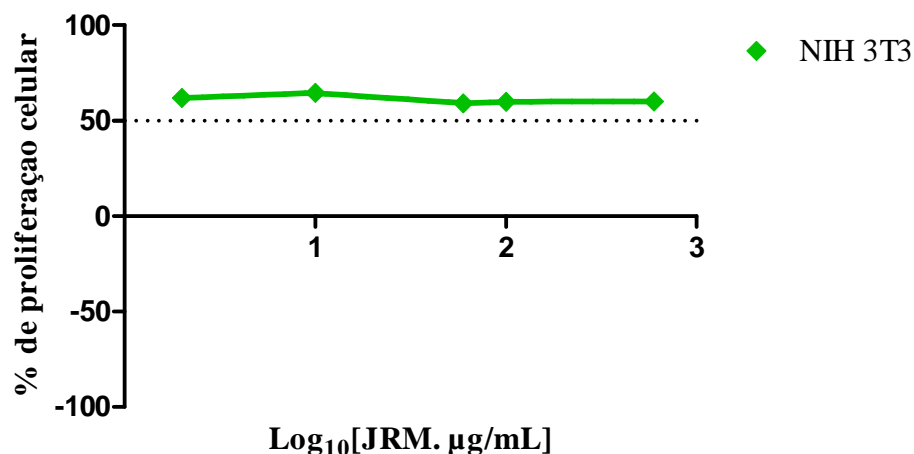
extratos e concentrações não demonstrou significância estatística com  $p > 0.05$ .

**Tabela 5.** Médias da porcentagem da proliferação celular da linhagem controle de Fibroblastos-NIH-3T3, mediante exposição de 72h aos extratos testados (**JRA, JRM, CEP e CEM**), nas diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões em relação ao controle.

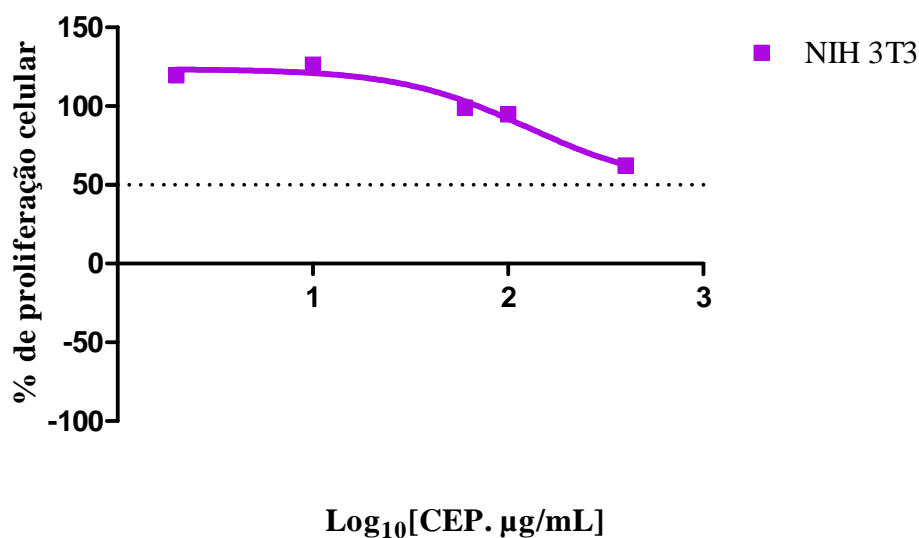
NIH-3T3				
Extratos	JRA % proliferação celular	JRM % proliferação celular	CEP % proliferação celular	CEM % proliferação celular
Concentração 1 [2 µg/mL]	56,798 ± 4.78	61,905 ± 0.008	119,279 ± 0.00	55,693 ± 2.13
Concentração 2 [10 µg/mL]	75,342 ± 9.13	64,536 ± 0.001	125,995 ± 0.01	46,739 ± 2.62
Concentração 3 [60 µg/mL]	63,474 ± 0.31	59,148 ± 0.008	99,005 ± 0.02	43,793 ± 0.68
Concentração 4 [100 µg/mL]	68,754 ± 6.64	59,962 ± 0.009	94,651 ± 0.04	41,842 ± 3.94
Concentração 5 [600 µg/mL]	74,966 ± 3.19	60,150 ± 0.009	62,189 ± 0.02	46,739 ± 2.46
Controle T	98,158 ± 1.84	100,000 ± 0.015	100,000 ± 0.00	99,479 ± 0.52



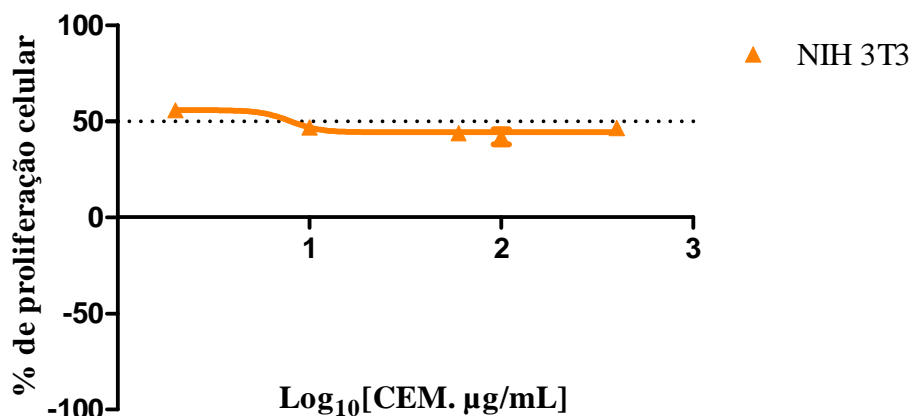
**Figura 17.** Atividade citotóxica do extrato aquoso da *Jodina rhombifolia* (JRA), sobre a linhagem controle de Fibroblastos- NIH-3T3, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média das porcentagens de proliferação celular obtidas em cada concentração.



**Figura 18.** Atividade citotóxica do extrato metanólico da *Jodina rhombifolia* (JRM), sobre a linhagem controle de Fibroblastos- NIH-3T3, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média da porcentagem de proliferação celular, obtidas em cada concentração.



**Figura 19.** Curva dose-resposta da atividade citotóxica do extrato de éter de petróleo da *Carapa guianensis* (CEP), sobre a linhagem controle de Fibroblastos- NIH-3T3, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média da porcentagem de proliferação celular obtidas em cada concentração.



**Figura 20.** Atividade citotóxica do extrato metanólico da *Carapa guianensis* (CEM), sobre a linhagem controle de Fibroblastos-NIH-3T3, nas cinco concentrações testadas de, pelo menos três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, demonstrando a média da porcentagem de proliferação celular obtidas em cada concentração.

**Tabela 6.** Resultados dos valores de  $CI_{50}^*$  e  $CIT^*$  obtidos dos extratos de *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem controle de Fibroblastos-NIH-3T3.

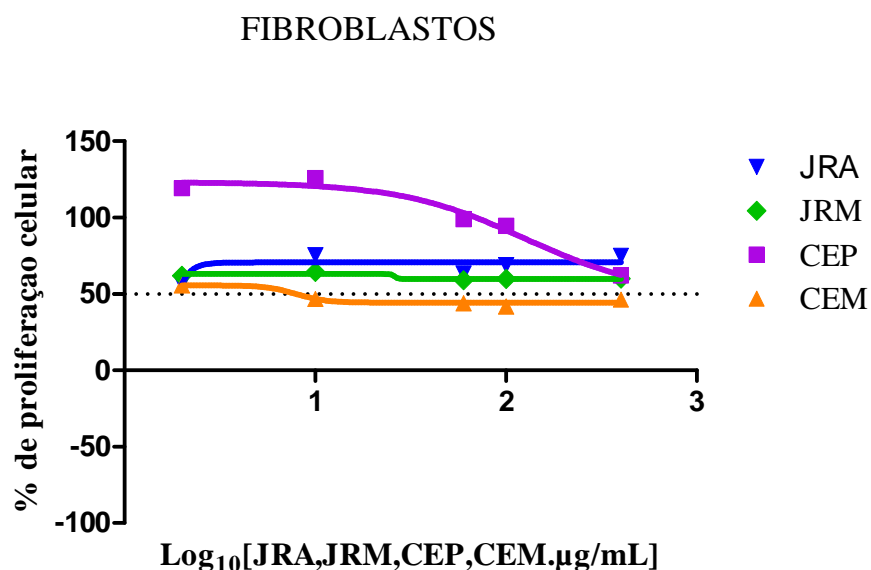
EXTRATOS	LINHAGEM CELULAR – FIBROBLASTOS - NIH-3T3	
	$CI_{50}^{**}$	$CIT^{**}$
JRA	ND	ND
JRM	ND	ND
CEP	ND	ND
CEM	7,94 µg/mL	ND

\* Determinado pelo ensaio de SRB; \*\* valores de  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50% do crescimento celular) e  $CIT$  (concentração que inibe 100% do crescimento celular) determinado por regressão não-linear da concentração versus porcentagem de inibição obtida em cada experimento.

ND resultado não detectado nas concentrações testadas

## 7.6. Comparação da atividade citotóxica de todos os extratos sobre a linhagem controle de Fibroblastos-NIH-3T3.

A Figura 20 demonstra comparativamente a atividade dos diferentes extratos testados sobre a linhagem estudada NIH-3T3, e os resultados obtidos apresentaram uma citotoxicidade semelhante entre os extratos, com diminuição da proliferação celular, porém sem provocar morte celular.



**Figura 21.** Atividade citotóxica dos extratos aquoso e metanólico da *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e dos extratos de éter de petróleo e metanólico da *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem controle de Fibroblastos-NIH-3T3.

## 8. DISCUSSÃO

Atualmente a biologia do câncer tem sido muito estudada e uma das principais linhas de pesquisas nesta área é o desenvolvimento de novos quimioterápicos.

Partindo do princípio que plantas e drogas derivadas de plantas têm uma impressionante variedade de estruturas e funções, está claro que podem ser a fonte de novas drogas para o tratamento do câncer, pois, atualmente, mais de 60% delas são derivadas de fontes naturais<sup>60, 61, 62</sup>.

A resistência adquirida ou inata à indução de morte pelas células tumorais frente aos tratamentos antitumorais convencionais constitui o principal obstáculo no tratamento de pacientes com câncer, especialmente nos casos de neoplasias hematológicas onde, ao contrário do que ocorre com tumores sólidos, o tratamento cirúrgico mostra-se pouco viável, fazendo com que a quimioterapia ainda seja a principal conduta terapêutica de escolha<sup>63</sup>.

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença maligna da medula óssea, onde mieloblastos expandem-se, acumulam-se e suprimem a atividade hematopoética normal<sup>13</sup>.

Apesar de todos os progressos no campo da onco-hematologia e da obtenção de índices de remissão pós-indução atingindo os 80%, a taxa de cura em LMA permanece em torno de 20%<sup>64</sup>.

A maioria dos pacientes recai dentro de um período de 12 a 18 meses. É bem provável que vários fatores estejam implicados na falha terapêutica e no baixo percentual de cura da LMA, entre estes a própria heterogeneidade da doença, o envolvimento de muitos rearranjos cromossômicos, a resistência a antraciclinas e à citarabina, o pico de acometimento na vida adulta, principalmente em indivíduos com *Performance Status* já comprometidos antes do diagnóstico e as contagens de leucócitos acima de 20.000/mm<sup>3</sup> são os principais responsáveis pela remissão não sustentada<sup>64, 65</sup>.

As células HL-60 - obtidas de Leucemia Mielóide Aguda - podem se diferenciar espontaneamente e esta diferenciação pode ser estimulada por butirato, hipoxantina, dimetilsulfóxido, actinomicina D e ácido retinóico<sup>14</sup>. Essas células apresentam atividade fagocítica, são responsivas à estimulação quimiotática, expressam o oncogene *myc*<sup>66</sup> e são muito utilizadas em experimentos que envolvem a morte celular programada<sup>67</sup>. Estas características, associadas ao fato de serem células de fácil manutenção *in vitro* e de terem crescimento em suspensão, não aderente, tornam esta linhagem um ótimo modelo biológico para o entendimento dos mecanismos associados à atividade antitumoral.

O linfoma de Burkitt (LB) tem origem numa célula derivada do centro germinativo que perde a regulação da proliferação em virtude da ativação do proto-oncogene *c-myc*<sup>2</sup> e superexpressão da proteína C-MYC. A perda da regulação dessa proteína resulta na ativação e repressão de pelo menos nove genes regulados por ela, entre os quais ciclina D1, p27, o gene da enzima lactatodesidrogenase A, p19ARF, p53, Bax, Fas e Fas ligante entre outros<sup>68, 69, 70</sup>.

A resistência a apoptose é uma causa importante da falha à quimioterapia na maioria dos cânceres e também no LB. Uma importante via que se encontra alterada no LB é a via mediada pela proteína p53. Essa via é importante para o controle da proliferação celular em resposta ao dano no DNA. Dados da literatura mostram uma correlação entre mutações do gene TP53 e a alta taxa de proliferação do LB (tempo de duplicação celular de 25 horas) como possíveis responsáveis pela resistência ao tratamento<sup>71</sup>.

A linhagem Daudi, derivada de um paciente com LB (apresentando uma mutação *nonsense* no códon 213) apresentou maior resistência ao quimioterápico Doxorubicina, quando comparado a outras linhagens do LB, com mutações *missense* nos códons 234 (Raji), 248 (Namalwa) e 254 (Ramos). Isso pode ser devido à natureza da mutação do gene *TP53* nessas linhagens<sup>71</sup>.

A alteração de outras vias relacionadas a apoptose em linhagens do LB sugere que, além da via mediada pela p53, outros mecanismos podem estar envolvidos<sup>72</sup>. Esta informação aumenta o valor da utilização de linhagens do LB como ferramenta de identificação na seleção de novas moléculas e drogas indutoras de apoptose<sup>73</sup>.

Devido ao complexo sistema de inter-relação e cruzamentos de sinais e vias na célula, existem muitas dificuldades em estabelecer fármacos que atuem em um único alvo celular, promovendo seu efeito terapêutico. Muitas vezes o desenvolvimento de mecanismos de resistência a fármacos (ou *multidrug resistance* – MDR) é o principal obstáculo para o sucesso no tratamento das neoplasias<sup>74</sup>.

O isolamento dos princípios ativos dos produtos naturais ainda brutos surge como alternativa para minimizar os riscos da introdução de novos produtos na indústria farmacêutica, e com isso encurtar os tempos de pesquisa, o que conseqüentemente aumenta o grau de especialização requerido para estas<sup>75</sup>.

Diversos fatores podem interferir na obtenção de extratos provenientes de plantas e na sua posterior utilização como fonte de novas drogas. Esse processo requer inúmeros cuidados, como perfeita identificação da planta e sua aplicação na fitoterapia; colheita da planta em local e época indicados; armazenamento da planta em boas condições; uso da dose indicada para a planta em questão; conhecimento pleno da doença e disposição de seguir o tratamento pelo período indicado<sup>76</sup>.

Plantas ricas em óleos essenciais devem ser colhidas pela manhã, ocasião em que ocorre uma maior concentração destes componentes, já a tarde o teor de óleos vai reduzindo-se devido a evaporação ocasionada pelo aumento da temperatura. Plantas cujo princípio ativo mais importante é alcalóides devem ser colhidas pela manhã, enquanto as ricas em glicosídeos ao final da tarde, quando a sua concentração é mais alta<sup>76</sup>.

A época da colheita também pode interferir no processo final. Conforme Franco (1996) e Korbes (1995), a concentração de princípios ativos atinge os valores mais elevados por ocasião da floração, devido provavelmente ao máximo acúmulo de massa seca na planta<sup>76,77,78</sup>.

O processo de secagem pode causar perdas de qualidade do material, além de afetar negativamente o valor terapêutico das plantas. Porém em outros casos sabe-se que o processo de secagem pode melhorar o poder fitoterápico das plantas, pois durante a secagem alguns produtos tóxicos podem ser oxidados, reduzindo sua toxicidade<sup>76</sup>.

Na secagem, também há aumento da concentração de determinados componentes, devido à perda de água. O teor de água do material entra em equilíbrio higroscópico com o teor de água do ambiente de secagem. Para

sementes, folhas e flores a umidade relativa do ar de secagem deve estar abaixo de 65%. Por outro lado, quando a umidade relativa (UR) do ar estiver igual ou superior a 70%, o material pode reabsorver a umidade do ar<sup>76</sup>.

A identificação de substâncias ativas presentes nas plantas, bem como a determinação do mecanismo de ação, constitui o principal desafio para a química farmacêutica e para a farmacologia, pois as espécies vegetais contêm inúmeros constituintes que nos extratos podem ter efeitos sinérgicos contribuindo com a mesma atividade ou ainda efeitos antagônicos<sup>79, 80</sup>.

Com o avanço das pesquisas de antibióticos e o aprimoramento das técnicas de cultura de tecidos e de microorganismos, foram desenvolvidos modelos experimentais *in vitro*, tornando possível a avaliação da quimiossensibilidade de microorganismos, células normais e tumorais. Porém, os ensaios *in vitro* ainda apresentavam, no início da década de 70, vários problemas técnicos; tais como: crescimento celular em cultura inadequado ou ausente (apenas 66% dos espécimes celulares se desenvolviam *in vitro*), contaminações freqüentes, ausência de padronização do tempo de exposição às drogas, da concentração utilizada e dificuldade na quantificação dos resultados<sup>81</sup>.

A transformação celular envolve mudanças num grande conjunto de propriedades, podendo causar alterações nas interações célula-célula, célula-substrato e célula-meio, induzindo a mudanças no comportamento e padrão de crescimento em cultura, dificultando o esclarecimento dos mecanismos de ação de substâncias avaliadas<sup>82, 83, 84</sup>.

Como a transformação celular *in vitro* apresenta relações com o processo de carcinogênese *in vivo* e pode ser induzida por diferentes agentes ela tem sido grandemente estudada como um processo análogo ao desenvolvimento neoplásico *in vivo*<sup>3</sup>.

O gráfico concentração-resposta é uma das formas onde melhor se visualiza a atividade antiproliferativa das amostras testadas. Com esse tipo de gráfico é possível verificar se o extrato ou fração avaliado possui efeito citostático (acima do ponto zero e abaixo de 50%) ou citocida (abaixo do ponto zero).

A triagem inicial da atividade inibitória da proliferação celular da linhagem neoplásica HL-60 foi realizada com os extratos metanólico (**JRM**) e aquoso (**JRA**) das folhas frescas e secas da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn., e o extrato metanólico (**CEM**) e etérico (**CEP**) (éter de petróleo) das sementes da planta *Carapa guianensis* Aubl.

Essas plantas foram selecionadas para os ensaios, por serem utilizadas pelos grupos de pesquisa envolvidos e já haver alguma evidência científica do seu efeito inibitório em cultura.

No ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* sobre a linhagem HL-60, os quatro extratos apresentaram atividade inibitória.

Os extratos que apresentaram maior atividade sobre a linhagem HL-60 foram os metanólicos de ambas as plantas (**JRM** e **CEM**). Apresentando  $CI_{50}$  com valores entre a segunda e terceira concentrações testadas. Ambos apresentaram CIT e morte celular.

O extrato metanólico da *Carapa guianensis* (**CEM**) foi o que obteve maior atividade, tanto de inibição de proliferação celular efeito conseguido desde a exposição à menor concentração do extrato (inibição de 25%) e mantido com as demais, como de morte celular. Este extrato obteve  $CI_{50} = 12,6 \mu\text{g} / \text{mL}$ , o menor valor entre os extratos testados.

Este efeito pode ser devido à presença no extrato metanólico da *Carapa guianensis* (**CEM**) de triterpenos. Substância presente em vários extratos e descrita na literatura como responsável pela atividade antiproliferativa sobre linhagens tumorais, como câncer de ovário, pulmão, mama, melanoma e leucemias<sup>85</sup>.

A maior atividade dos extratos metanólicos pode ser devido ao método de obtenção dos mesmos, que possa ter conseguido através do solvente metanólico uma maior extração do princípio ativo.

O fracionamento dos extratos brutos da planta *Jodina rhombifolia*, por infravermelho e cromatografia gasosa, permitiu a identificação de metil ésteres dos ácidos graxos – éster do ácido mirístico, éster do ácido esteárico, éster do ácido oléico, éster do ácido linoleico e éster do ácido linolênico<sup>86</sup>, podendo estes serem responsáveis pela melhor atividade dedectada deste extrato.

O extrato aquoso (**JRA**) da *Jodina rhombifolia* apresentou atividade antiproliferativa e morte celular, porem foi necessária a exposição à maior concentração do extrato testado ( $600 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) para obter efeito sobre a linhagem HL-60.

O extrato **CEP** não apresentou morte celular e os valores de  $CI_{50}$  e CIT não foram determinados, sendo provavelmente superior a maior concentração testada. Este extrato necessita ser testado com concentrações mais elevadas para buscar a determinação da  $CI_{50}$  e CIT, sobre a linhagem HL-60.

Vários estudos estão sendo realizados objetivando o melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos no efeito antiproliferativo e morte celular das células neoplásicas hematológicas.



A morte celular induzida pelo manganês em células HL-60 apresenta características típicas de apoptose como perda do potencial de membrana mitocondrial, exposição de fosfatidilserina, ativação de caspase-3/7, clivagem de substratos de caspases, clivagem internucleossomal de DNA, e mudança da morfologia celular. Na linhagem HL-60, o tratamento com manganês parece induzir autofagia como uma tentativa de salvar a célula da morte<sup>87</sup>.

Em outro estudo avaliando a ação citotóxica da riboflavina sobre as células HL60, foi observado a dependência da ativação da via extrínseca de indução de apoptose, resultado dos aumentos na expressão de Fas e FasL, da síntese de ceramida e amplificação da atividade da maquinaria intracelular de morte, através do recrutamento mitocondrial. O processo é acompanhado por alteração da atividade de MAPKs, inibição de moléculas mediadoras de sobrevivência e proliferação celular, alteração dos níveis de fosfoproteínas e redução na atividade de metaloproteinases<sup>88</sup>.

Células HL60 tratadas com fisetin (flavonóide de origem vegetal) apresentaram aumento na expressão da subunidade p65 do fator de transcrição NFκB, ativação das MAPKs p38 e JNK, aumento nos níveis de fosfoproteínas e inibição de enzimas envolvidas na manutenção do estado redox<sup>89</sup>.

A fração clorofórmio de *Ipomoea pes-caprae* foi citotóxica para células leucêmicas, modulando negativamente a super-expressão da proteína antiapoptótica bcl2 e sugerindo apoptose como o processo de morte envolvido. O extrato metanólico e as frações diclorometano, hexano e acetato de etila de *Vernonia scorpioides* parecem modular negativamente a super-expressão da proteína antiapoptótica bcl2 e sugerindo apoptose como o processo de morte envolvido<sup>90</sup>.

Várias plantas e seus extratos têm sido testados para avaliação da atividade citotóxica sobre a linhagem HL-60, como o alcalóide pipartina obtido das espécies de *Piper*, demonstrou atividade citotóxica frente à linhagem HL-60<sup>91</sup>. Preparações etanólicas de *Uncaria tomentosa*, tendo maior citotoxicidade à preparação com predominância de alcalóides pteropodina e isomitrafalina<sup>92</sup>. O extrato aquoso de *Oldenlandia diffusa* também apresentou atividade citotóxica sobre a linhagem HL-60<sup>93</sup>. Da mesma forma, os extratos etanólico, clorofórmico e hexânico de *Varthemia iphionoides*, planta utilizada popularmente no Jordão, demonstraram citotoxicidade dependente da dose sobre essas células, sendo que este potencial terapêutico foi atribuído à presença de flavonóides<sup>94</sup>.

Recentemente, extratos preparados de *Oplopanax horridus* e de *Pinus densiflora* exibiram efeitos inibidores da proliferação de células HL-60<sup>95,96</sup>. Assim como extratos etanólicos da *Lactuca indica* L. exercem efeito apoptótico específico sobre células HL-60, não afetando a sobrevivência de linfócitos normais isolados do sangue periférico<sup>97</sup>.

A fração acetato de etila do extrato da erva medicinal chinesa *Sarcandra glabra* mostrou maior sensibilidade sobre a proliferação de células HL-60, com detenção do ciclo celular e com a regulação das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bcl-2<sup>98</sup>. De forma semelhante, o extrato dos rizomas de *Rhodiola rosea*, amplamente utilizada na medicina popular da Rússia e da China, com indução de apoptose e necrose<sup>93</sup>. Este mesmo efeito foi observado para o extrato de *Selaginella tamariscina*, com ativação da via das caspases<sup>100</sup>.

Extratos metanólicos de *Jatropha elliptica*, *Physalis angulata* e *Tephrosia cinerea*, três plantas medicinais brasileiras características do Ceará, expressaram suas propriedades citotóxicas sobre células HL-60<sup>101</sup>.

O efeito antiproliferativo pode variar entre linhagens devido a diferenças no tempo de duplicação celular, quando comparamos, por exemplo, as leucemias que apresentam um curto tempo de duplicação comparado a alguns tumores sólidos que apresentam duplicação mais lenta<sup>102</sup>.

A atividade inibitória da proliferação celular da linhagem neoplásica Linfoma Daudi realizada com os extratos metanólico (**JRM**) e aquoso (**JRA**) das folhas frescas e secas da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn., e o extrato metanólico (**CEM**) e etérico (**CEP**) das sementes da planta *Carapa guianensis* Aubl., demonstrou resultado diferente dos testes realizados com a Linhagem HL-60.

No Linfoma Daudi os extratos que obtiveram maior efeito antiproliferativo foram os da planta *Jodina rhombifolia* (**JRA** e **JRM**), com inibição da proliferação ( $CI_{50}$  e CIT) e morte celular e o extrato etérico da planta *Carapa guianensis* Aubl. (**CEP**).

O extrato aquoso (**JRA**) foi o que apresentou um efeito mais intenso com obtenção de ( $CI_{50}$  e CIT) com valores de 41,09  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 55,90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, ou seja, entre a segunda e terceira concentração testada o que também pode ser observado em relação à morte celular. Sendo o extrato que proporcionou morte celular com o menor valor, comparado aos demais.

Os extratos (**JRM**) e (**CEP**) apresentaram atividade antiproliferativa bastante semelhantes. Apresentando  $CI_{50}$  com valores bastante próximos de 49,31  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 53,18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Apresentaram tanto  $CI_{50}$ , CIT e morte celular com as mesmas concentrações. Embora a curva dose-resposta obtida tenha um comportamento distinto entre os extratos, sobre a linhagem Linfoma Daudi.

O extrato metanólico (**CEM**) apesar de obtido  $CI_{50}$ , não obteve CIT e não provocou morte celular nas concentrações testadas sobre a linhagem Linfoma Daudi. Efeito este inverso ao que ocorreu sobre a Linhagem HL-60, onde este extrato provocou o melhor resultado.

Segundo BEIRA, 2000 o extrato aquoso (**JRA**) não apresentou atividade proliferativa sobre as linhagens tumorais de adenocarcinoma de pâncreas (Bx-PC3 e PANC), adenocarcinoma de cólon (HT-29) em concentrações semelhantes, não sendo possível determinar  $CI_{50}$ . Entretanto este extrato apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) obtendo  $CI_{50} = 30 \mu\text{g} / \text{mL}$ <sup>41</sup>. Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem certa seletividade deste para linhagens hematológicas.

Em avaliação da atividade antineoplásica do extrato metanólico (CEM) da *Carapa guianensis* com concentrações semelhantes sobre células de carcinoma de boca (KB) foi obtida  $CI_{50}$  (58,74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e CIT (65,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), o que não foi observado como extrato etérico (CEP)<sup>103</sup>.

As neoplasias hematológicas avaliadas apesar de provocarem manifestações semelhantes e apresentarem cultivo em suspensão são entidades bastante distintas, apresentam fisiopatogenia diferente (mielóide e linfóide), justificando comportamento diferente em relação aos extratos testados.

Resultado de estudo com extratos preparados das sete principais variedades de oliva (*Olea europaea* L.) que predominam na Tunísia, assim como o de *Scutellaria baicalensis*, utilizada na medicina popular chinesa demonstrou efeito antiproliferativo semelhante sobre as linhagens Linfoma Daudi e HL-60<sup>104,105</sup>.

Em estudo realizado com extratos das plantas *Himatanthus lancifolius*, *Casearia sylvestris* Sw., *Rauwolfia sellowii* e *Bauhinia microstachya*, sobre o comportamento das linhagens celulares hematológicas humanas HL-60, K-562, Daudi e REH, independente de sua origem linfóide ou mielóide, demonstrou que os extratos hidroetanólicos preparados dessas plantas exercem efeitos citostáticos significativos em doses de até 100 mg/mL e que esta atividade foi particular para cada extrato e dependente da linhagem celular estudada<sup>106</sup>.

A atividade inibitória da proliferação celular da linhagem controle não neoplásica de Fibroblastos- NIH-3T3, realizada com os mesmos extratos testados nas linhagens neoplásicas (HL-60 e Linfoma Daudi), não demonstrou inibição, sugerindo seletividade dos extratos testados nas linhagens hematopoiéticas. O efeito obtido sobre os fibroblastos foi bastante semelhante entre os quatro extratos testados, onde não ocorreu morte celular e determinação de CIT. Porém o extrato metanólico (CEM) da planta *Carapa guianensis* Aubl. foi o único que obteve  $CI_{50}$ , sendo que este efeito não se manteve com o aumento das concentrações.

Avaliando os resultados obtidos podemos observar que os fibroblastos sofrem uma ação inicial quando expostos aos extratos, mas essa não se mantém com o aumento das concentrações. Este efeito poderia estar relacionado à interferência dos extratos na adesão dos fibroblastos a placa de cultivo e também

a velocidade menor de multiplicação celular dos mesmos, tendo em vista ser linhagem não neoplásica, cuja duplicação ocorre em torno de três dias.

O extrato que apresentou menor atividade sobre os fibroblastos foi o **CEP**, que mesmo com a maior concentração testada, manteve média de proliferação em torno de 60%, sem sofrer ação antiproliferativa inicial.

Os extratos **JRA** e **CEM** apresentaram uma atividade citotóxica semelhante, com ação inicial com diminuição da proliferação em relação ao controle, porem sem aumento da atividade com o aumento das concentrações.

Os fibroblastos como linhagem de controle tem um papel importante na avaliação dos efeitos citotóxicos dos extratos avaliados, pois a atividade dos mesmos é importante não apenas nas linhagens neoplásicas, mas também em linhagens celulares não tumorais, objetivando a identificação de substâncias com seletividade celular. Isto em relação ao tratamento clínico é de importância fundamental, tendo em vista que a maioria dos tratamentos utilizados atualmente contra o câncer provoca muitos efeitos colaterais.

Esses resultados demonstram que os extratos obtidos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. e *Carapa guianensis* Aubl. tiveram efeito anti-proliferativo em células neoplásicas de origem hematopoiéticas e esta atividade não foi evidenciada na linhagem controle de fibroblastos, confirmando nossa hipótese inicial. Sendo aconselhado expandir essas pesquisas, buscando a identificação de princípios ativos, com intuito de se obter medicação que venha a ter utilização clínica.

## 8. Referências

- 1- Ministério da Saúde, Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. (Online). Disponível: <http://inca.org.br//epidemiologi/estimativa2010/2011> (acesso: 1 de maio de 2011).
- 2- OMS (1997). Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde (C. d. O. p. c. d. D. e. P. E. S. Paulo, ed.), Vol. 1. OMS.
- 3- IARC/NCI/EPA Working Group. Cellular and molecular mechanisms of transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols. *Cancer Res* 1985; 45: 2395-2399.
- 4- Bretani RR, Cahmmas R, Coelho FRG. Mecanismos de invasão e metástases. *Bases da Oncologia*. 1ª ed., São Paulo: Livraria e Editora Marina; 1998.
- 5- Simpson AJG, Caballero OL, Dani SU. Oncogeneses e genes supressores. *Bases da Oncologia*. 1ª ed., São Paulo: Livraria e Editora Marina; 1998.
- 6- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Cancer Chemoterapy. In: *Pharmacology*. 3ed. Churchill Livingstone, New York: 1995: 696-717, 1995.
- 7- Mans DR, Rocha AB, Schwartsmann G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 2000; 5: 185-98.
- 8- Garrett MD, Workman P. Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third Millennium. *Eur Journ of Cancer* 1999; 99: 280-284.
- 9- Hamburguer M, Hostettmann K. Bioactivity in Plants: The link between phitochemistry and medicine. *Phytochemistry* 1991; 30 (12): 3864-3874.
- 10- Fellows LE. New drugs from natural sources. London: IBC Technical Services, 1995.

- 11-Cragg GM, Newman DJ. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. *Cancer Investigation* 1999; 17( 2):153-163.
- 12-Tsiftoglou AS, Bonovolias ID, Tsiftoglou AS. Multilevel targeting of hematopoietic stem cell self-renewal, differentiation and apoptosis for leukemia therapy. *Pharmacol therap* 2009; 122 (3): 264-280.
- 13-Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia-Fundamentos e Prática*. 1ed. Atheneu, 2001.
- 14-Collins SJ et al. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Medical Sciences* 1987; 75: 2458-2462.
- 15- Kaiser S. *Non-Hodgkin's Lymphoma and Hodgkin's Lymphoma*. Biochem 118,2004
- 16-Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Pires M. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*. 2003; 101:1120-35.
- 17-Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma.*Blood* 2004; 104: 3009-3020.
- 18- ([www.cccancer.net/downloads/linfoma\\_net.pdf](http://www.cccancer.net/downloads/linfoma_net.pdf))
- 19- [http://www.abrale.org.br/doencas/linfoma/sub\\_nao\\_hodgkin.php](http://www.abrale.org.br/doencas/linfoma/sub_nao_hodgkin.php)
- 20-Purves D, Harvey C, Tweats D, Lumley CE. 1995. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. *Mutagenesis* 1995; 10: 297-312.
- 21-Baguley BC, Hicks KO, Wilson WR. Tumor cell cultures in drugdevelopment. *In: Anticancer Drug Development*. Academic Press Auckland 2002:397.
- 22-Masters JRW, Twentyman P, Daley R, Davis J, Doyle A, Dyer S, Freshney I, Galpine A, Harrison M, Hurst H, Kelland L, Stacey G, Stratford I, Ward TH. UKCCCR guidelines for the use of cell lines in cancer research. *Br J Cancer*. 2000; 82: 1495-1509.

- 23-Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979; 54:713-33.
- 24-Huber C, Sundstrom C, Nilsson K, Wigzell H. Surface receptors on human haematopoietic cell lines. *Clin Exp Immunol.* 1976; 25: 367-76.
- 25-Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford H. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res* 1968; 28:1300-10.
- 26-Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
- 27-Ferraz A, Faria DH, Benneti MN, Rocha AB, Schwartzmann G, Henriques A, Von Poser GL. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine* 2005; 12: 112-5.
- 28-Bombardelli EB. Twenty years' experience in the botanical health food market. *Fitoterapia* 2005; 76: 495-507.
- 29-Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 757-66.
- 30-Cohen E, Quistad GB, Casida JE. Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide. *Life Sci* 1996; 58: 1075-81.
- 31-Freshney RI. "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique," 5th/Ed: John Wiley & Sons Inc; 2005.
- 32-Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC2. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr Med Chem* 2001; 8: 1467-86.
- 33-Backes P, Irgang B. In: *Árvores do Sul: Guia de identificação e Interesse Ecológico.* Instituto Souza Cruz, Rio Grande do Sul; 2002.
- 34-Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas.* Nova Odessa, São Paulo; 2002.

- 35-Schultz A. In: Introdução à Botânica Sistemática. Editora Sagra, Porto Alegre; 1990; 2:87-88.
- 36-Norverto LCA. Evolución de *las Santalaceae*. Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias 2004; 22: 1668-1940.
- 37-Hopkins CY, Chisholm MJ, Cody WJ. Fatty acid components of some *Santalaceae seed oils*. Phytochemistry 1969; 8: 161-165.
- 38-Spitzer V, Bordignon SAD, Schenkel EP, Max F. Identification of 9 acetylenic fatty-acids, 9-hydroxystearic acid and 9, 10-epoxystearic acid in the seed oi of *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. (*Santalaceae*). J Amer Oil Chem Soc 1994; 71: 1343-1348.
- 39-Alice CB, Vargas VM, Silva GA, Siqueira NC, Schapoval EE *et al.* Screening of plants used in south Brazilian folk medicine.J Ethnopharmacol 1991; 35: 165-71.
- 40-Vargas VM, Guidobono RR, Henriques JA. Genotoxicity of plant extracts. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86 (2): 67-70.
- 41-Beira FTA. Evaluación de la actividad antineoplásica de extractos de la planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. [tese] Barcelona: Universidad de Barcelona; 2000.
- 42-Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. J Ethnopharmacol 2000; 73: 347-77.
- 43-Hammer ML, Johns EA. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajo Island, Para (Brazil). J Ethnopharmacol 1993; 40: 53-75.
- 44-Loureiro AA, Silva MF. Catálogo das Madeiras da Amazônia, SUDAM, Belém; 1968.
- 45-Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MF, Pereira JF, Siani AC, Henriques MG. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. Inflamm Res 2005; 54: 295-303.
- 46-Silva OS, Romao PR, Blazius RD, Prohiro JS. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. J Am Mosq Control Assoc 2004; 20: 456-7.



- 47-Connolly JD, McCrindle R, Overton KH, Feeney J. Tetranortriterpenoids. 2. Heartwood constituents of *Carapa guianensis* Aubl. Tetrahedron 1966; 22: 891-896.
- 48-Ollis WD, Ward AD, Zelnik R. Andirobin. Tetrahedron Letters 1970; 37(8): 2607-2614.
- 49-Qi SH, Wu DG, Ma YB, Luo XD. A novel flavane from *Carapa guianensis*. Acta Botanica Sinica 2003; 45: 1129-1133.
- 50-Siqueira DS, Pereira AS, Aquino FR, Cabral JA, Ferreira CAC, Simoneit BRT, Elias VO. Determination of high molecular mass compounds from Amazonian plant's leaves. Quim Nova 2003; 26.
- 51-Andrade EH, Zoghbi MD, Maia JG. Volatiles from the leaves and flowers of *Carapa guianensis* Aubl. J of Essential Oil Research 2001; 13: 436-438.
- 52-Albuquerque JM. Plantas Mediciniais de Uso Popular. Editora MEC, Brasília; 1989.
- 53-Barker K. Na Bancada: Manual de Iniciação Científica em Laboratórios de Pesquisas Biomédicas. Porto Alegre: Artemed, 2002.
- 54-Itharat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Sampson JH, Raman A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. J Ethnopharmacol 2004; 90: 33-8.
- 55-Estrela, C. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: Metodologia Científica: ensino e pesquisa em odontologia. Artes Médicas, São Paulo; 2001.
- 56-Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR. Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1113-1118.
- 57-Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. Journal of Immunological Methods 1997; 208 (2): 151-8.
- 58-Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols 2006; 1: 1112-6.

- 59-Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:1107-1112.
- 60-Rates SMK. Plants as Source of Drugs. *Toxicon* 2001; 39: 603-13.
- 61-Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* 1997; 53: 121-133.
- 62-Cragg GM, Newman DJ. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 72-79.
- 63-Kappelmayer J, Simon A, Kiss F, Hevessy Z. Progress in defining multidrug resistance in leukemia. *Expert. Rev. Mol. Diagn* 2004; 4: 209-217.
- 64-Appelbaum FP, Gilliland G, Tallman MS. The Biology and Treatment of Acute Myeloid Leukemia. American Society of Hematology- Education Program Book 1998; 15-43.
- 65-Baudard M, Beauchamp-Nicoud A, Delmer A, Rio B, Blanc CM, Zittoun R, Marie JP. Has the prognosis of adult patients with acute myeloid leukemia improved over years? A single institution experience of 784 consecutive patients over a 16 year. *Leukemia* 1999; 13: 1.481-1.490.
- 66-Gallagher R. *et al.* Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979; 54: 713-733.
- 67-Veiga VF *et al.* Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2005; 42: 61-74.
- 68-Hecht J, Aster J. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3703-21.
- 69-Coller H, Grandori C, Tamayo P *et al.* Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals the Myc regulates genes involved in growth, cell cycle signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3260-5.
- 70-Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Pires M. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003; 101:1120-35.

- 71-Magluta EP, Klumb CE. Resistência ao tratamento no linfoma de Burkitt: Associação com mutações específicas no gene TP53? Rev bras hematol hemoter 2008; 30 (1): 41-46.
- 72-Meijerink JP, Mensink EJ, Wang K et al. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. Blood. 1998; 91(8): 2991-7.
- 73-Doucet JP, Hussain A, Al-Rasheed M et al. Differences in the expression of apoptotic proteins in Burkitt's lymphoma cell lines: potential models for screening apoptosis-inducing agents. Leuk Lymphoma. 2004; 45(2): 357-62.
- 74-Gottesman MM, Fojo T, Bates E. Multidugs resistance in cancer: role of ATPdependent transporters. Nature Reviews 2002; 2: 48-58.
- 75-Cavalla D. Technology Providers and Integrators – A Virtual Architecture for Drug R&D. In: Bristol, J. A. Annual Reports in Medicinal Chemistry 1998; 33: 365.
- 76-Bevilaqua GAP, Schiedeck G, Schwengber JE. Identificação e tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado-ISSN 1981-5999 VERSÃO ONLINE, CIRCULAR TÉCNICA 61, Pelotas/RS, dezembro 2007.
- 77-Franco LB. As sensacionais 50 plantas medicinais. Curitiba: Santa Monica, 1996.
- 78-Korbes VC. Plantas medicinais. 48. Ed. Francisco Beltrão: ASSESSOAR, 1995.
- 79-Maciél AAM, Pinto AC, Veiga VF. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. Quim Nova 2002; 25 (3): 429-438.
- 80-Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and Abuses of in Vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an Elephant. J Ethnopharmacol 2007; 110: 391- 400.
- 81-Hamburguer M, Hostettmann K. Bioactivity in Plants: the Link between Phytochemistry and Medicine. Phytochemistry 1991; 30(12): 3964-74.
- 82-Klaunig J, Ruch RJ. Biology of disease: role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. Lab. Invest 1990; 62: 135-146.

- 83-Holzer C, Maier P, Zbinden G. Comparison of exogenous growth stimuli for chemically transformed cells: growth factors, serum and cocultures. *Exp. Cell Bio* 1986; 54: 237-244.
- 84-Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 1991; 64: 271-280.
- 85-Silva DA. Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica e antiproliferativa da espécie *Luehea candicans* Mart et Zucc. (Tiliaceae) [Dissertação] Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2004.
- 86-Costa JH, Silva VM, Sassi JS, Del Pino FAB, Beira FTA. Atividade antitumoral e caracterização parcial dos compostos bioativos do extrato metanólico de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn- Estudo apresentado no XVIII CIC UFPEL, 2009.
- 87-Carvalho E. Morte celular induzida pelo manganês em linhagens tumorais [Dissertação] Instituto Nacional do Câncer (INCA); 2009.
- 88-Souza ACS, Gadelha FR, Cavagis ADM, Aoyama H, Ferreira CV. A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death-Apoptosis DOI 10.1007/s10495-006-9549-2 Published online: 21 August 2006 C - Springer Science + Business Media, LLC 2006.
- 89- Sousa RRR, Queiroz KCS, Souza ACS, Gurgueira AS *et al.* Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFκB expression are affected by fisetin *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (in press); 2006.
- 90-Cesaro F. Avaliação das atividades linfoproliferativa e citotóxica dos extratos Metanólicos e frações de *Ipomea pes-caprae* e *Vernonea Scorpiodes* [Dissertação] Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí; 2009.
- 91-Bezerra DP, Militao GCG, Castro FO, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MAS, Elmiro FJM, Costa-Lotuf LV. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicology in Vitro* 2007; 21(1): 1-8.
- 92-Pilarski R, Poczekaj-Kostrzewska M, Ciesiolka D, Szyfter K, Gulewicz K. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Pharmacological Reports* 2007; 59(1): 565-572.

- 93-Willimoltt S, Barker J, Jones LA, Opara EI. Apoptotic effect of *Oldenlandia diffusa* on the leukaemic cells line HL-60 and human lymphocytes. J Ethnopharmacol 2007; 114(1): 290-299.
- 94-Al-Dabbas MM, Suganuma T, Kitahara K, Hou DX, Fujii M. Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Varthemia iphionoides* Boiss extracts. J Ethnopharmacol 2006; 108: 287-93.
- 95-Tai J, Cheung S, Cheah S, Chan E, Hasman D. In vitro antiproliferative and antioxidant studies on Devil's Club *Oplopanax horridus*. J Ethnopharmacol 2006; 108:228-35.
- 96-Kwak CS, Moon SC, Lee MS. Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). Nutr Cancer 2006; 56: 162-71.
- 97-Chen YH, Chen HY, Hsu CL, Yen GC. Induction of apoptosis by the *Lactuca indica* L. in human leukemia cell line and its active components. J Agric Food Chem 2007; 55: 1743-9.
- 98-Li WY, Chiu LC, Lam WS, Wong WY *et al.* Ethyl acetate extract of Chinese medicinal herb *Sarcandra glabra* induces growth inhibition on human leukemic HL-60 cells, associated with cell cycle arrest and up-regulation of pro-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio. Oncol Rep 2007; 17:425-31.
- 99-Majewska A, Hoser G, Furmanowa M, Urbanska N, Pietrosiuk A, Zobel A, Kuras M. Antiproliferative and antimitotic effect, S phase accumulation and induction of apoptosis and necrosis after treatment of extract from *Rhodiola rosea* rhizomes on HL-60 cells. J Ethnopharmacol 2006; 103:43-52.
- 100- Ahn SH, Mun YJ, Lee SW, Kwak S *et al.* 2006. *Selaginella tamariscina* induces apoptosis via a caspase-3 mediated mechanism in human promyelocytic leukemia cells. J Med Food 2006; 9: 138-44.
- 101-Faria MH, Carvalho TG, Rabenhorst SH, Sidrim JJ, Moraes-Filho MO. Cytotoxic and antifungal properties of medicinal plants from Ceara, Brazil. Braz J Biol 2006; 66: 1133-5.
- 102-Michael R. Boyd, MD, PhD-The NCI In: Vitro Anticancer Drug Discovery Screen Concept, Implementation, and Operation, 1985-1995.

- 103-Oliveira SGD, Lund RG, Nedel F, Begnini K, Sassi JS, Beira FTA, Del Pino FAB. Avaliação da atividade citotóxica e/ou antineoplásica dos extratos de *Carapa guianensis* Aubl. em linhagens celulares tumorais e não-tumorais. Estudo apresentado XVII CIC/X ENPOS/ XVII Congresso Iniciação Científica UFPEL / X Encontro Pós-graduação 2008.
- 104-Kumagai T, Muller CI, Desmond JC, Imai Y, Heber D, Koeffler HP. *Scutellaria baicalensis*, a herbal medicine: anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines. *Leuk Res* 2007; 31: 523-30.
- 105-Abaza L, Talorete TP, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, Isoda H. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 1306-12.
- 106-Lima MP. Influência dos extratos de *Casearia sylvestris*, *Bauhinia microstachya*, *Rauvolfia sellowii* e *Himatanthus lancifolius* sobre o comportamento de Células HL-60, K-562, DAUDI E REH. [Dissertação] Paraná: Universidade Federal do Paraná; 2008.

## ARTIGO

### **Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de extratos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook.et Arn. e *Carapa guianensis* Aubl. sobre células HL-60, Linfoma Daudi e Fibroblastos NIH-3T3**

#### **Resumo**

**Introdução** - A incidência de câncer aumenta anualmente, sendo uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Sessenta por cento dos quimioterápicos são derivados de fontes naturais.

**Objetivo** - O presente trabalho objetivou avaliar a atividade antiproliferativa de extratos obtidos a partir de folhas da *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. (metanólico e aquoso) e de sementes de *Carapa guianensis* Aubl. (metanólico e etérico).

**Métodos** - A atividade dos extratos foi avaliada por ensaio colorimétrico com Sulforodamina B (SRB) sobre as linhagens celulares tumorais humanas de Leucemia Mielóide Aguda (HL-60), Linfoma Daudi e fibroblastos embrionários murinos (NIH-3T3), como células controle. As linhagens celulares foram cultivadas em placas de microculturas, e foram incubadas com cinco concentrações diferentes dos extratos (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL) por um período de 72 horas. Para determinar o efeito antiproliferativo foi realizada leitura das placas em espectrofotômetro. Com os resultados obtidos a partir das concentrações testadas de cada extrato, foi gerada uma curva dose-resposta e determinadas a  $CI_{50}$  e CIT. Para análise estatística dos resultados, usou-se o teste de regressão linear para as diferentes concentrações. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

**Resultados** - O extrato metanólico da *Carapa guianensis* foi o que apresentou maior atividade antiproliferativa sobre a linhagem HL-60, com  $CI_{50}=12,6$  µg/mL e CIT=80,5 µg/mL ( $p < 0.05$ ). Sobre a linhagem Linfoma Daudi o extrato aquoso da *Jodina rhombifolia* apresentou melhor efeito, com  $CI_{50}=41,09$  µg/mL e CIT=55,90 µg/mL ( $p < 0.05$ ). Não houve inibição estatisticamente significativa nos controles ( $p > 0.05$ ).

**Discussão**- Esses resultados demonstram que os extratos obtidos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn e *Carapa guianensis* Aubl têm efeito anti-proliferativo em células neoplásicas de origem hematopoiéticas, sendo aconselhado expandir essas pesquisas, buscando obter fármaco que venha a ter utilização clínica.

**Palavras Chaves:** Leucemia; linfoma; fitoterapia; cultura de células

***In vitro* anti-proliferative activity of extracts from *Jodina rhombifolia* Hook & Arn. and *Carapa guianensis* Aubl. on HL-60 cells, Daudi lymphoma and NIH-3T3 fibroblasts**

**Abstract**

**Introduction-**The incidence of cancer increases annually and is considered one of the main causes of mortality worldwide. Sixty-percent of chemotherapics were obtained from natural sources. **Objective** - this study aimed to assess the antiproliferative activity of extracts from leaves of *Jodina rhombifolia* Hook. Et Arn. (methanolic and watery) and seeds of *Carapa guianensis* Aubl. (methanolic and etheric). **Methods** - The extract activity was assed by sulforhodamine B colorimetric assay (SRB) on human tumor cell lines of acute myeloid leukemia (HL-60), Daudi Lymphoma and mouse embryonic fibroblasts (NIH-3T3), as control cells. The cell lines were grown using microculture plates and were incubated with five different extract concentrations (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL) for 72 hours. The anti-proliferative effect was determined by the use of a microplate reader spectrophotometer. With the obtained results a dose-response curve was generated and the IC<sub>50</sub> and ICT values were determined. For statistical analysis the was used with linear regression for different concentrations. The p<0.05 values were considered statistically significant. **Results** – The methanolic extract from *Carapa guianensis* presented the highest anti-proliferative activity on HL-60 line, with IC<sub>50</sub> = 12.6 µg/mL and ICT = 80.5 µg/mL (p<0.05). On Daudi Lymphoma line, the aqueous extract of *Jodina rhombifolia* presented the best effect: CI<sub>50</sub> = 41.09 µg/mL and ICT = 55.90 µg/mL (p<0.05). No statistically significant inhibition was found in control cells (p>0.05). **Discussion-** The results showed that the extracts obtained from the plants *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. and *Carapa guianensis* Aubl. have anti-proliferative effect on neoplastic cells of hematopoietic origin. Further studies are necessary to obtain new drugs for clinical use.

**Keywords:** Leukemia; lymphoma; phytotherapy; cell culture



## 1. Introdução

O câncer configura-se como um grande problema de saúde pública e sua incidência aumenta anualmente, sendo uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares, infecções e doenças parasitárias, responsáveis por, respectivamente, 30 e 19% das mortes<sup>1</sup>.

Dentre as neoplasias, as hematológicas constituem um grupo bastante distinto, não apenas pelas manifestações clínicas usualmente muito severas, mas, também, pelo seu tratamento agressivo e grande morbi-mortalidade. Destacamos as leucemias, que são decorrentes do desequilíbrio entre as taxas de proliferação, maturação e apoptose das células hematopoiéticas comumente associadas a polimorfismos gênicos e os linfomas que são os tumores hematológicos mais comuns e estão entre as dez neoplasias mais incidentes no mundo<sup>2</sup>.

Existe uma necessidade constante de descobrir novos e mais efetivos fármacos para o seu tratamento<sup>3</sup>. A importância das plantas medicinais está na sua contribuição como fonte natural de fármacos, devido à diversidade de constituintes químicos presentes na sua composição<sup>4</sup>.

A avaliação da atividade de extratos e frações de plantas medicinais poderá levar à identificação e ao isolamento de novas substâncias com potencial aplicação na terapêutica humana contra o câncer. O Brasil, por possuir uma riqueza inestimável, representada pela biodiversidade de sua flora, aparece como um importante centro na busca de novos fármacos derivados de plantas medicinais<sup>3</sup>.

O presente trabalho objetivou avaliar a atividade antiproliferativa de extratos obtidos a partir de folhas da *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. (metanólico e aquoso) e de sementes de *Carapa guianensis* Aubl. (metanólico e etérico).

A *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. é uma espécie da família *Santalaceae* largamente empregada na medicina caseira para o tratamento de úlceras crônicas, carcinomas, problemas estomacais, resfriados e outras afecções<sup>5,6,7</sup>. É uma planta nativa do Sul do Brasil, localizada principalmente na Mata de Pinhais de Santa Catarina e na depressão central do Rio Grande do Sul, mas também pode ser encontrada no Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai.

A *Carapa guianensis* Aubl. é uma espécie da família *Meliaceae*, nativa da região Amazônica, que se localiza no Brasil na própria Bacia da Amazônia e região do norte do Pará até o sul da Bahia, além de algumas localidades da América Central, Antilhas e África Tropical. Esta planta apresenta uma larga aplicação na medicina popular, dentre as quais se destaca sua ação analgésica, antiinflamatória, antiartrítica, antitumoral, larvicida e antimicrobiana<sup>8, 9, 6, 10, 11, 12</sup>.

Não há informações sobre seus usos em linhagens neoplásicas de origem hematológica.

## 2. Materias e Métodos

### 2.1. Extratos

**Preparo dos Extratos da planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.** Foram pesados 30g de material vegetal seco e moído foi adicionado à amostra 600 ml de água deionizada em ebulição, e a mistura macerada sob agitação magnética por uma hora. A mistura resultante foi filtrada a vácuo resultando no extrato aquoso (**JRA**). À parte sólida, retida no filtro, foram adicionados 300 ml de álcool metílico destilado, o sistema foi mantido sob agitação magnética por 8 horas. Ao final do período a mistura foi filtrada. Ao final das três extrações sucessivas, os extratos foram homogeneizados e identificados como Extrato Metanólico (**JRM**).

**Preparo dos Extratos da planta *Carapa guianensis* Aubl.**

Sementes moídas da planta permaneceram por dois dias, em éter de petróleo para a extração. Após o extrato foi filtrado e destilado obtendo-se o óleo das sementes. O resíduo foi submetido novamente à extração no Soxhlet com éter de petróleo, para remoção de gorduras residuais. Desta forma, obteve-se o extrato de éter de petróleo (**CEP**). Algumas foram submetidas à extração com solvente metanol resultando no extrato metanólico (**CEM**).

Os extratos obtidos foram dissolvidos em água ultrapura e dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec) de acordo com a sua solubilidade<sup>13</sup>. Depois de esterilizados por filtração foram preparadas cinco diluições (2.0, 10.0, 60.0, 100.0 e 600.0 µg/mL). As concentrações finais testadas em cada cavidade foram determinadas de acordo com os resultados obtidos em *screening* inicial.

### 2.2. Linhagens Celulares e Cultivo Celular

As linhagens celulares utilizadas na triagem da atividade antiproliferativa das plantas em teste foram: linhagem HL-60 derivada de leucemia aguda prómielocítica (LPA) e a linhagem de Linfoma Daudi originada de Linfoma Burkitt. Como linhagem controle foi utilizada a linhagem murina não neoplásica de fibroblastos-NIH-3T3. Todas as linhagens celulares foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro/RJ/Brasil (BCRJ).

As linhagens neoplásicas proliferam em suspensão em frasco de cultivo (25 cm<sup>2</sup>, Nunc<sup>®</sup>), mantidas em estufa de cultura (Incubadora Teknal TE-399) a temperatura de 37°C, em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>), suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal (SBF; Cultilab<sup>®</sup>) e antibióticos (100 kU/L de penicilina e 100 mg/L de estreptomicina; Sigma<sup>®</sup>).

A linhagem NIH-3T3 prolifera em monocamada aderida à superfície do frasco de cultivo (25 cm<sup>2</sup>, Nunc<sup>®</sup>), mantida em estufa de cultura (Incubadora Teknal TE-

399) a temperatura de 37°C, em meio de cultivo DMEM (Gibco®), suplementado com SBF a 10% (Cultilab®) e antibióticos (100 kU/L de penicilina e 100 mg/L de estreptomicina; Sigma®).

Todas as linhagens celulares foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro/RJ/Brasil (BCRJ).

### **2.3. Avaliação atividade antiproliferativa**

Foram inoculados 100 µL de células em meio RPMI (Gibco®) /SFB (Cultilab®), na densidade de inoculação de  $4 \times 10^4$  células/mL, em placas de 96 compartimentos (Bio-TeK), que a seguir foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. Após esse período foram adicionados 100 µL dos extratos a serem testados, sendo realizada neste momento, a fixação da placa T0. As demais placas foram incubadas por 72 horas e utilizadas para realização dos testes com as diferentes concentrações dos extratos e controles<sup>14</sup>.

Foram utilizadas, no mínimo, duas placas de microcultivo com 96 cavidades (Bio-TeK), para cada linhagem, por ensaio. Foram realizadas de três a cinco réplicas para cada concentração do extrato (T) e controles em pelo menos três experimentos independentes. Após este período foram realizadas as leituras da densidade óptica por ensaio colorimétrico realizado mediante adição de 100µL de uma solução de Sulforodamina B (SRB; Sigma®) 0,4% p/v (com ácido acético 1%; Synth) em cada cavidade dos testes e controles.

Com os resultados obtidos a partir das concentrações testadas de cada extrato, foi gerada uma curva dose-resposta, através do software estatístico GraphPad Prism 5.00 e determinadas a concentração do extrato inibitória capaz de reduzir 50% do crescimento celular (CI<sub>50</sub>) e concentração do extrato que causa uma inibição total do crescimento celular (CIT). Para análise estatística dos resultados, usou-se o programa SPSS13.0, com teste de regressão linear para as diferentes concentrações dos extratos. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **3. Resultados**

### **3.1. Atividade inibitória sobre a linhagem HL-60:**

A tabela 1 mostra os dados obtidos com a linhagem HL-60, nas cinco concentrações testadas, as curvas dose-resposta obtidas são demonstradas na figura 1.

Com o extrato JRA observa-se atividade citotóxica, ocorrendo morte celular comparada ao controle e CI<sub>50</sub> = 363,9 µg/mL e CIT = 529,6 µg/mL. Houve significância estatística em teste de regressão linear ( $p < 0.05$ ).

O extrato JRM, obteve CI<sub>50</sub> = 28,1 µg/mL e CIT = 424,6, µg/mL, houve significância estatística ( $p < 0.05$ ).

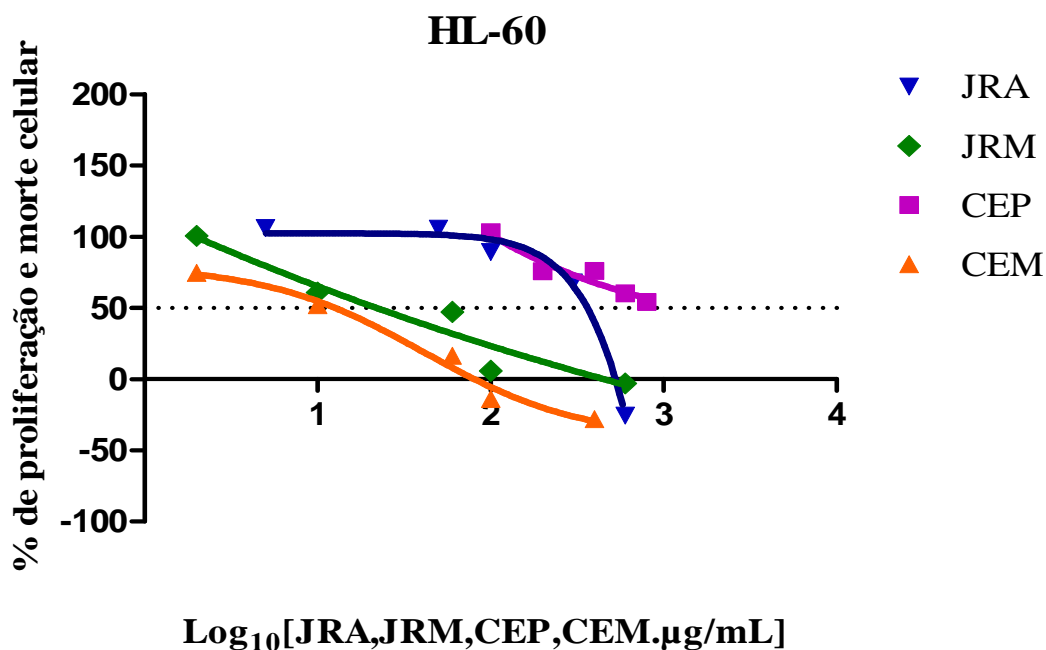
O extrato CEP apresentou atividade citotóxica com inibição da proliferação celular ( $p < 0.05$ ), comparado ao controle, porém não apresentou  $CI_{50}$  e CIT nas concentrações testadas, necessitando a realização de novos experimentos com concentrações mais elevadas.

Com o extrato CEM podemos observar que o mesmo apresentou atividade citotóxica, ocorrendo morte celular, houve significância estatística em teste de regressão linear ( $p < 0.05$ ) e apresentou valores para  $CI_{50} = 12,6 \mu\text{g/mL}$  e  $CIT = 80,5 \mu\text{g/mL}$ .

A tabela 4 demonstra os valores de  $CI_{50}$  e CIT.

**Tabela 1.** Médias da porcentagem da proliferação e morte celular da linhagem HL-60 mediante exposição de 72h aos extratos testados (JRA, JRM, CEP e CEM), nas diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões em relação ao controle.

HL-60				
Extratos	JRA % proliferação e morte celular	JRM % proliferação e morte celular	CEP % proliferação celular	CEM % proliferação e morte celular
Concentração 1 [2 $\mu\text{g/mL}$ ]	106, 141 $\pm 6.04$	100, 557 $\pm 32.09$	103, 164 $\pm 44.78$	74, 612 $\pm 37.49$
Concentração 2 [10 $\mu\text{g/mL}$ ]	105, 461 $\pm 0.74$	60, 856 $\pm 42.340$	75, 684 $\pm 26.56$	51, 893 $\pm 31.43$
Concentração 3 [60 $\mu\text{g/mL}$ ]	89, 295 $\pm 6.75$	47, 268 $\pm 59.01$	75, 839 $\pm 25.83$	16, 351 $\pm 21.14$
Concentração 4 [100 $\mu\text{g/mL}$ ]	68, 011 $\pm 4.77$	5, 875 $\pm 47.97$	60, 325 $\pm 31.59$	- 13, 961 $\pm 16.34$
Concentração 5 [600 $\mu\text{g/mL}$ ]	-25, 640 $\pm 0.43$	-3, 102 $\pm 37.99$	54, 004 $\pm 57.56$	-27, 985 $\pm 4.75$
Controle T	109, 986 $\pm 0.01$	111, 061 $\pm 0.92$	107, 070 $\pm 0.07$	100, 297 $\pm 0.29$



**Figura 1.** Atividade citotóxica dos extratos, aquoso e metanólico, da *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e dos extratos de éter de petróleo e metanólico da *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem HL-60.

### 3.2. Atividade inibitória sobre a linhagem Linfoma Daudi

A tabela 2 mostra os achados obtidos com essa linhagem, nas diferentes concentrações testadas, e as curvas dose-resposta podem ser observadas na figura 2.

O extrato JRA como pode ser observado apresentou atividade citotóxica, ocorrendo inibição da proliferação celular, comparado ao controle, com significância estatística em teste de regressão linear ( $p < 0.05$ ). Os valores encontrados para a  $CI_{50}$  e CIT foram  $41,09 \mu\text{g/mL}$  e  $55,90 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Com o extrato JRM foi observado inibição da proliferação celular e morte celular, com significância estatística ( $p < 0.05$ ). Esta atividade citotóxica pode ser verificada na Tabela 2 e a curva dose-resposta correspondente, esta demonstrada na Figura 2. Foram obtidos valores de  $CI_{50} = 49,31 \mu\text{g/mL}$  e  $CIT = 262,92 \mu\text{g/mL}$ .

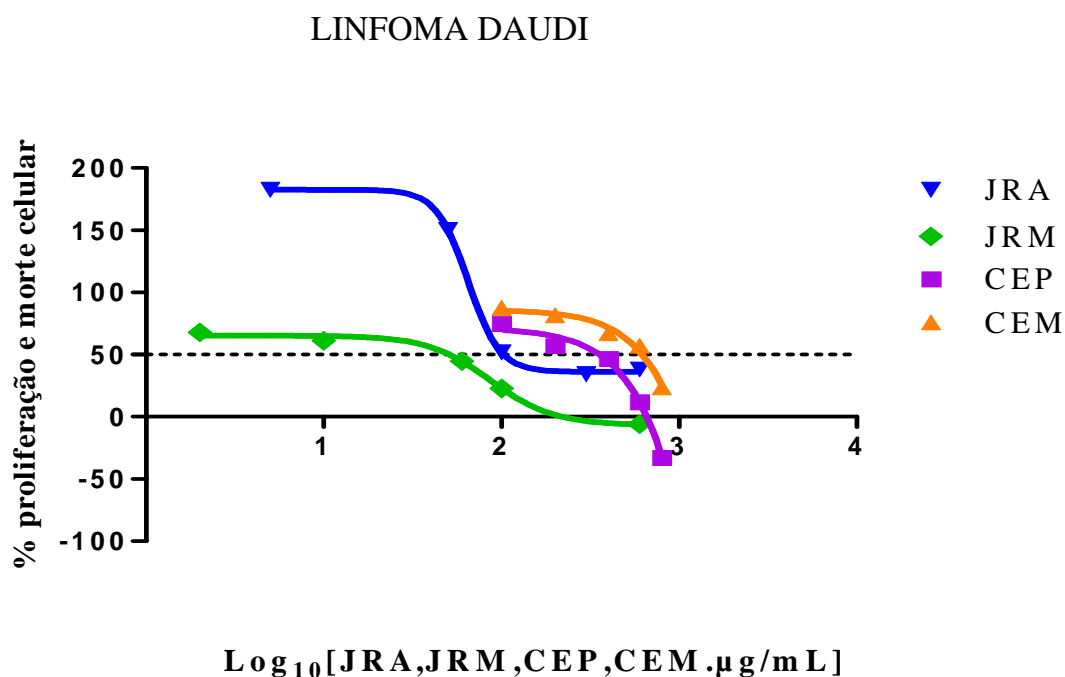
O extrato CEP provocou inibição da proliferação e morte celular, com  $CI_{50}$  de  $53,18 \mu\text{g/mL}$  e CIT de  $457,65 \mu\text{g/mL}$ , com significância estatística ( $p < 0.05$ ).

Com o extrato CEM houve inibição da proliferação celular, porém não apresentou morte celular, apesar disso houve significância estatística na comparação com controles ( $p < 0.05$ ). Este extrato apresentou  $CI_{50} = 146,21 \mu\text{g/mL}$  e CIT não foi obtida nas concentrações testadas.

A tabela 4 demonstra os valores de  $CI_{50}$  e CIT.

**Tabela 2.** Médias da porcentagem de proliferação e morte celular da linhagem de Linfoma Daudi, mediante exposição de 72h aos extratos testados (**JRA, JRM, CEP e CEM**), nas cinco diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões em relação ao controle.

LINFOMA DAUDI				
Extratos	JRA % proliferação e morte celular	JRM % proliferação e morte celular	CEP % proliferação e morte celular	CEM % proliferação celular
Concentração 1 [2 µg/mL]	158, 821 ± 39.14	67, 714 ± 5.79	74, 826 ± 14.43	87, 711 ± 12.56
Concentração 2 [10 µg/mL]	94, 054 ± 22.88	61, 105 ± 5.93	56, 927 ± 9.13	81, 593 ± 17.24
Concentração 3 [60 µg/mL]	- 9, 013 ± 32.20	44, 724 ± 11.63	46, 688 ± 4.56	67, 202 ± 13.80
Concentração 4 [100 µg/mL]	-14, 960 ± 28.26	22, 752 ± 14.88	11, 857 ± 7.93	56, 904 ± 11.29
Concentração 5 [600 µg/mL]	-20, 192 ± 38.26	-5, 960 ± 24.46	-33, 007 ± 16.54	23, 796 ± 2.84
Controle T	136, 011 ± 32.17	105, 281 ± 5.70	100, 796 ± 0.93	99, 616 ± 0.60



**Figura 2.** Atividade citotóxica dos extratos, aquoso e metanólico, da *Jodina rhombifolia* (**JRA** e **JRM**) e dos extratos de éter de petróleo e metanólico da *Carapa guianensis* (**CEP** e **CEM**) sobre a linhagem Linfoma Daudi.

### 3.3. Atividade inibitória sobre a linhagem Fibroblastos-NIH-3T3 (controle)

Os resultados obtidos com o ensaio colorimétrico dos extratos em teste sobre a linhagem NIH-3T3, estão demonstrados na tabela 3 e na figura 3.

Os extratos JRA, JRM e CEP apresentaram atividade antiproliferativa, porém, não obtiveram  $CI_{50}$  e CIT. Estes resultados podem ser observados na tabela 4.

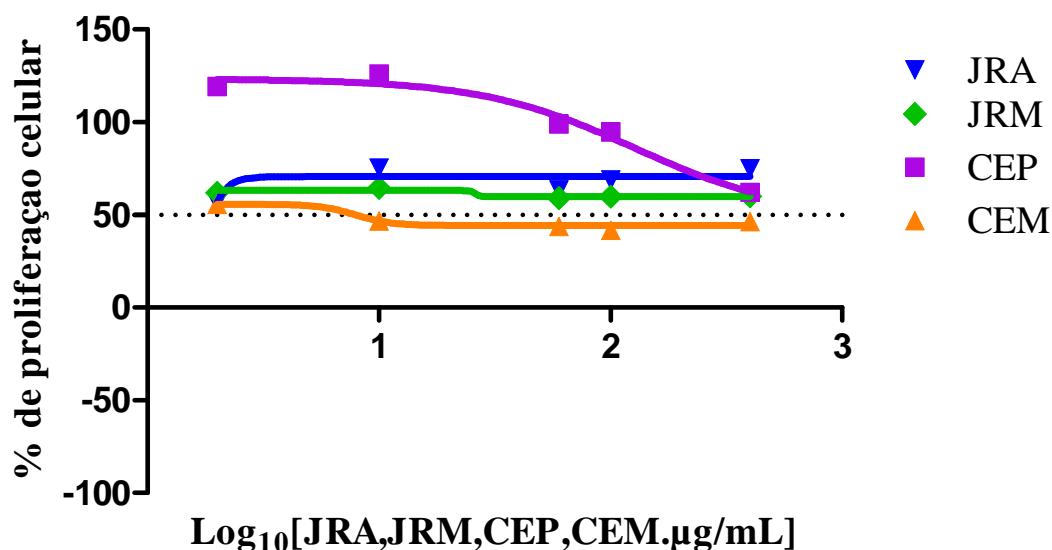
O extrato CEM foi o que provocou maior atividade citotóxica com diminuição da proliferação celular e  $CI_{50} = 7,94 \mu\text{g/mL}$ , com a menor concentração testada. Entretanto este efeito não foi mantido com as concentrações mais elevadas, onde não houve acréscimo do efeito.

Os resultados obtidos dos testes dos extratos sobre a linhagem NIH-3T3, não apresentaram significância estatística ( $p > 0.05$ ) e também não produziram curva dose-resposta.

**Tabela 3.** Médias da porcentagem da proliferação celular da linhagem controle de Fibroblastos-NIH-3T3, mediante exposição de 72h aos extratos testados (**JRA, JRM, CEP e CEM**), nas diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões em relação ao controle.

NIH-3T3				
Extratos	JRA % proliferação celular	JRM % proliferação celular	CEP % proliferação celular	CEM % proliferação celular
Concentração 1 [2 $\mu\text{g/mL}$ ]	56,798 $\pm 4.78$	61,905 $\pm 0.008$	119,279 $\pm 0.00$	55,693 $\pm 2.13$
Concentração 2 [10 $\mu\text{g/mL}$ ]	75,342 $\pm 9.13$	64,536 $\pm 0.001$	125,995 $\pm 0.01$	46,739 $\pm 2.62$
Concentração 3 [60 $\mu\text{g/mL}$ ]	63,474 $\pm 0.31$	59,148 $\pm 0.008$	99,005 $\pm 0.02$	43,793 $\pm 0.68$
Concentração 4 [100 $\mu\text{g/mL}$ ]	68,754 $\pm 6.64$	59,962 $\pm 0.009$	94,651 $\pm 0.04$	41,842 $\pm 3.94$
Concentração 5 [600 $\mu\text{g/mL}$ ]	74,966 $\pm 3.19$	60,150 $\pm 0.009$	62,189 $\pm 0.02$	46,739 $\pm 2.46$
Controle T	98,158 $\pm 1.84$	100,000 $\pm 0.015$	100,000 $\pm 0.00$	99,479 $\pm 0.52$

### FIBROBLASTOS-NIH-3T3



**Figura 3.** Atividade citotóxica dos extratos aquoso e metanólico da *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e dos extratos de éter de petróleo e metanólico da *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem controle de Fibroblastos-NIH-3T3.

**Tabela 4.** Resultados dos valores de  $CI_{50}^*$  e  $CIT^*$  obtidos dos extratos de *Jodina rhombifolia* (JRA e JRM) e *Carapa guianensis* (CEP e CEM) sobre a linhagem HL-60, Linfoma Daudi e fibroblastos-NIH-3T3.

EXTRATO	HL-60		LINFOMA DAUDI		NIH-3T3	
	$CI_{50}^{**}$	$CIT^{**}$	$CI_{50}^{**}$	$CIT^{**}$	$CI_{50}^{**}$	$CIT^{**}$
JRA	363,9 µg/mL	529,6 µg/mL	41,09 µg/mL	55,90 µg/mL	ND	ND
JRM	28,1 µg/mL	424,6 µg/mL	49,31 µg/mL	262,92 µg/mL	ND	ND
CEP	ND	ND	53,18 µg/mL	457,65 µg/mL	ND	ND
CEM	12,6 µg/mL	80,5 µg/mL	146,21 µg/mL	ND	7,94 µg/mL	ND

\* Determinado pelo ensaio de SRB; \*\* valores de  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50% do crescimento celular) e  $CIT$  (concentração que inibe 100% do crescimento celular) determinado por regressão não-linear da concentração versus porcentagem de inibição obtida em cada experimento.

ND resultado não detectado nas concentrações testadas



## Discussão

A biologia do câncer tem sido muito estudada. Drogas derivadas de plantas têm uma impressionante variedade de estruturas e funções, podendo ser a fonte de novas drogas para o tratamento do câncer. Atualmente, mais de 60% dos quimioterápicos são derivados de fontes naturais<sup>15, 16, 17</sup>.

Especialmente nos casos de neoplasias hematológicas onde, ao contrário do que ocorre com tumores sólidos, o tratamento cirúrgico mostra-se pouco viável, a quimioterapia tem papel fundamental no sucesso terapêutico<sup>18</sup>.

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) apesar de atingir índices de remissão pós-indução de 80%, permanece com taxa de cura em torno de 20%, sendo importante obter novas terapêuticas<sup>19</sup>.

As células HL-60 - obtidas de Leucemia Mielóide são um ótimo modelo biológico para o entendimento dos mecanismos associados à atividade antileucêmica.

O linfoma de Burkitt (LB) tem origem numa célula derivada do centro germinativo que perde a regulação da proliferação em virtude da ativação do proto-oncogene *c-myc*<sup>2</sup> e superexpressão da proteína C-MYC<sup>20, 21, 22</sup>. A linhagem Daudi, a qual foi obtida do LB, serve como modelo *in vitro* para estudo do LB.

As plantas *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn e *Carapa guianensis* Aubl foram selecionadas para os ensaios, por serem utilizadas pelos grupos de pesquisa envolvidos e já haver alguma evidência científica do seu efeito inibitório em cultura de células<sup>24, 30</sup>.

Nos nossos resultados os extratos que apresentaram maior atividade sobre a linhagem HL-60 foram os metanólicos de ambas as plantas (**JRM** e **CEM**). Esses apresentaram  $CI_{50}$  com valores entre a segunda e terceira concentrações testadas. Ambos apresentaram CIT e morte celular.

O extrato metanólico da *Carapa guianensis* (**CEM**) foi o que obteve maior atividade, tanto de inibição quanto de morte celular, efeito conseguido desde a exposição à menor concentração do extrato (inibição de 25%) e mantido com as demais. Este extrato obteve  $CI_{50} = 12,6 \mu\text{g} / \text{mL}$ , o menor valor entre os extratos testados.

Este efeito pode ser devido à presença no extrato metanólico da *Carapa guianensis* (**CEM**) de triterpenos. Substância presente em vários extratos e descrita na literatura como responsável pela atividade antiproliferativa sobre linhagens tumorais, como câncer de ovário, pulmão, mama, melanoma e leucemias<sup>23</sup>.

A maior atividade dos extratos metanólicos pode ser devido ao método de obtenção dos mesmos, que possa ter conseguido através do solvente metanólico uma maior extração de um princípio ativo.

O fracionamento dos extratos brutos da planta *Jodina rhombifolia*, por infravermelho e cromatografia gasosa, permitiu a identificação de metil ésteres dos ácidos graxos – éster do ácido mirístico, éster do ácido esteárico, éster do ácido oléico, éster do ácido linoleico e éster do ácido linolênico<sup>24</sup>, podendo estes serem responsáveis pela melhor atividade detectada deste extrato.

O extrato aquoso (**JRA**) da *Jodina rhombifolia* apresentou atividade antiproliferativa e morte celular, porem foi necessária a exposição à maior

concentração do extrato testada (600 µg /mL) para obter efeito sobre a linhagem HL-60.

O extrato **CEP** não apresentou morte celular com a linhagem HL-60 e os valores de  $CI_{50}$  e CIT não foram determinados, sendo, se houver superiores a maior concentração testada.

Em outro estudo avaliando a ação citotóxica da riboflavina sobre as células HL60, foi observado a dependência da ativação da via extrínseca de indução de apoptose, resultado dos aumentos na expressão de Fas e FasL, da síntese de ceramida e amplificação da atividade da maquinaria intracelular de morte, através do recrutamento mitocondrial. O processo é acompanhado por alteração da atividade de MAPKs, inibição de moléculas mediadoras de sobrevivência e proliferação celular, alteração dos níveis de fosfoproteínas e redução na atividade de metaloproteinases<sup>25</sup>.

Células HL60 tratadas com fisetin (flavonóide de origem vegetal) apresentaram aumento na expressão da subunidade p65 do fator de transcrição NFκB, ativação das MAPKs p38 e JNK, aumento nos níveis de fosfoproteínas e inibição de enzimas envolvidas na manutenção do estado redox<sup>25</sup>.

De forma semelhante, já foi demonstrada inibição da linhagem HL-60 com as plantas *Ipomoea pes-caprae*, *Vernonia scorpioides*, *Piper*, *Oldenlandia diffusa* e preparações etanólicas de *Uncaria tomentosa*, tendo maior citotoxicidade a preparação com predominância de alcalóides pteropodina e isomitrafalina<sup>26, 27, 28, 29</sup>.

No Linfoma Daudi os extratos que obtiveram maior efeito antiproliferativo foram os da planta *Jodina rhombifolia* (**JRA** e **JRM**), com inibição da proliferação ( $CI_{50}$  e CIT) e morte celular e o extrato etérico da planta *Carapa guianensis* Aubl. (**CEP**).

O extrato aquoso (**JRA**) foi o que apresentou um efeito mais intenso com obtenção de ( $CI_{50}$  e CIT) com valores de 41,09 µg /mL e 55,90 µg /mL, respectivamente, ou seja, entre a segunda e terceira concentração testada o que também pode ser observado em relação à morte celular. Sendo o extrato que proporcionou morte celular com o menor valor, comparado aos demais.

Segundo BEIRA, 2000 o extrato aquoso (**JRA**) não apresentou atividade antiproliferativa sobre as linhagens tumorais de adenocarcinoma de pâncreas (Bx-PC3 e PANC), adenocarcinoma de cólon (HT-29) em concentrações semelhantes, não sendo possível determinar  $CI_{50}$ . Entretanto este extrato apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem de adenocarcinoma de mama humano- MCF-7 obtendo  $CI_{50}$ = 30 µg /mL<sup>30</sup>. Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem certa seletividade deste para linhagens hematológicas.

Os extratos (**JRM**) e (**CEP**) apresentaram atividade antiproliferativa bastante semelhantes. Apresentando  $CI_{50}$  com valores bastante próximos de 49,31 µg /mL e 53,18 µg /mL, respectivamente. Apresentaram tanto  $CI_{50}$ , CIT e morte celular com as mesmas concentrações.

O extrato metanólico (**CEM**) apesar de obtido  $CI_{50}$ , não obteve CIT e não provocou morte celular nas concentrações testadas sobre a linhagem Linfoma Daudi. Efeito este inverso ao que ocorreu sobre a Linhagem HL-60, onde este extrato provocou o melhor resultado.

As neoplasias hematológicas avaliadas apesar de provocarem manifestações semelhantes e apresentarem cultivo em suspensão são entidades bastante distintas, apresentam fisiopatogenia diferente, justificando comportamento diferente em relação aos extratos testados.

A atividade inibitória da proliferação celular da linhagem controle não neoplásica de Fibroblastos- NIH-3T3, realizada com os mesmos extratos testados nas linhagens neoplásicas (HL-60 e Linfoma Daudi), não demonstrou inibição, sugerindo seletividade dos extratos testados nas linhagens hematopoiéticas.

O efeito obtido sobre os fibroblastos foi bastante semelhante entre os quatro extratos testados, onde não ocorreu morte celular e determinação de CIT. Porém o extrato metanólico (**CEM**) da planta *Carapa guianensis* Aubl. foi o único que obteve  $CI_{50}$ , sendo que este efeito não se manteve com o aumento das concentrações, e não houve significância estatística.

Os fibroblastos como linhagem de controle tem um papel importante na avaliação dos efeitos citotóxicos dos extratos avaliados, pois a atividade dos mesmos é importante não apenas nas linhagens neoplásicas, mas também em linhagens celulares não tumorais, objetivando a identificação de substâncias com seletividade celular. Isto em relação ao tratamento clínico é de importância fundamental, tendo em vista que a maioria dos tratamentos utilizados atualmente contra o câncer provoca muitos efeitos colaterais.

Nossos resultados demonstram que os extratos obtidos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn e *Carapa guianensis* Aubl têm efeito anti-proliferativo em células neoplásicas de origem hematopoiéticas, sendo aconselhado expandir essas pesquisas, com fracionamento e purificação dos mesmos, com objetivo de se obter fármaco que venha a ter utilização clínica.

## Referências

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani, P. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2002; 55: 74-108.
2. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia-Fundamentos e Prática. 1ª ed. Atheneu; 2001.
3. Ferraz A, Faria DH, Benneti MN, Rocha AB, Schwartzmann G, Henriques A, Von Poser GL. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. Phytomedicine 2005; 12:112-115.
4. Bombardelli EBV. Twenty years experience in the botanical health food market. Fitoterapia 2005; 76: 495-507.
5. Backes P, Irgang B. In: Árvores do Sul: Guia de identificação e Interesse Ecológico. Instituto Souza Cruz, Rio Grande do Sul 2002; 278-279.
6. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Nova Odessa, São Paulo 2002.

7. Schultz A. In: *Introdução à Botânica Sistemática*. Editora Sagra, Porto Alegre 1990; 2:87-88.
8. Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. *J Ethnopharmacol* 2000; 73: 347-77.
9. Hammer ML, Johns EA. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajo Island, Pará (Brazil). *J Ethnopharmacol* 1993; 40: 53-75.
10. Loureiro AA, Silva MF. *Catálogo das Madeiras da Amazônia, SUDAM, Belém* 1968.
11. Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MF, Pereira JF, Siani AC, and Henriques, M. G. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res* 2005; 54: 295-303.
12. Silva OS, Romao PR, Blazius RD, Prohiro JS. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 2004; 20: 456-7.
13. Itharat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Sampson JH, Raman A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol* 2004; 90: 33-8.
14. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, and et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 199; 83: 757-66.
15. Rates SMK. Plants as Source of Drugs. *Toxicon* 2001; 39: 603-13.
16. Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* 1997; 53: 121-133.
17. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 72-79.
18. Kappelmayer J, Simon A, Kiss F, Hevessy Z. Progress in defining multidrug resistance in leukemia. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 209-217.
19. Appelbaum FP, Gilliland G, Tallman MS. *The Biology and Treatment of Acute Myeloid Leukemia*. American Society of Hematology- Education Program Book 1998; 15-43.

20. Hecht J, Aster J. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3703-21.
21. Coller H, Grandori C, Tamayo P et al. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals the Myc regulates genes involved in growth, cell cycle signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3260-5.
22. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Pires M. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003; 101:1120-35.
23. Silva DA. Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica e antiproliferativa da espécie *Luehea candicans* MART et ZUCC. (*TILIACEAE*) [Dissertação] Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2004.
24. Costa JH, Silva VM, Sassi JS, Del Pino FAB, Beira FTA. Atividade antitumoral e caracterização parcial dos compostos bioativos do extrato metanólico de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn- Estudo apresentado no XVIII CIC UFPel, 2008
25. Souza ACS. Mecanismo da ação antineoplásica de substâncias bioativas e alvos moleculares estratégicos para a indução de morte de células tumorais [tese] Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2006.
26. Cesario, F. Avaliação das atividades linfoproliferativa e citotóxica dos extratos Metanólicos e frações de *Ipomea pes-caprae* e *Vernonea Scorpiodes* [Dissertação] Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí; 2009.
27. Bezerra DP, Militao GCG, Castro FO, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MAS, Elmiro FJM, Costa-Lotufo LV. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicology in Vitro* 2007; 21(1): 1-8.
28. Pilarski R, Poczekaj-Kostrzewska M, Ciesiolka D, Szyfter K, Gulewicz K. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Pharmacological Reports* 2007; 59(1): 565-572.
29. Willimoltt S, Barker J, Jones LA, Opara EI. Apoptotic effect of *Oldenlandia diffusa* on the leukaemic cells line HL-60 and human lymphocytes. *J Ethnopharmacol* 2007; 114(1): 290-299.
30. BEIRA FTA. Evaluación de la actividad antineoplásica de extractos de la planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. [Tesis] Barcelona: Universidad de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); 2000.