



COMPOSTO GFC INDUZ CITOTOXICIDADE NA LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL HUMANO HT-29

Gabriela Mendonça dos Reis¹

Jessica Machado Miri²

Alexandre de Barros Falcão Ferraz³

Ivana Grivicich⁴

Resumo

O câncer colorretal (CRC) é uma neoplasia maligna que atinge a parede interna do intestino grosso e seu tratamento geralmente requer ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, somente 40% dos pacientes com CRC avançado respondem a terapia. Na busca de novas estratégias de tratamento, produtos naturais que podem induzir morte celular estão atraindo cada vez mais atenção. O garcinielliptona FC (GFC) é um composto isolado das sementes da espécie *Platonia insignis* Mart. e estudos demonstram que ele é citotóxico em linhagens celulares tumorais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico do composto GFC na linhagem celular de adenocarcinoma colorretal HT-29. Para isto, a linhagem celular HT-29 foi exposta ao GFC por 24 h, 48 h e 72 h em concentrações variando de 0 -100 µg/mL e seu efeito citotóxico foi avaliado pelo ensaio colorimétrico de MTT. O antineoplásico 5-fluorouracil foi utilizado como controle positivo. Também foi avaliado o efeito do GFC na distribuição das células no ciclo celular por citometria de fluxo. Os valores de IC₅₀ do GFC para os tempos de 24 h, 48 h e 72 h foram 7,9 ± 0,2 µg/mL, 10,6 ± 1,1 µg/mL 6,0 ± 1,1 µg/mL, respectivamente. A avaliação do ciclo celular mostrou um aumento de células na fase G2/M após tratamento com GFC por 24 h. Até o momento, os resultados demonstraram que o composto GFC apresenta significativa citotoxicidade na linhagem celular HT-29, e que este efeito parece estar associado com bloqueio na fase G2/M do ciclo celular.

P

alavras chave: Câncer colorretal; Garcinielliptone FC; Citotoxicidade, Ciclo celular

1 Aluna do curso de graduação Biomedicina – Bolsista PIBIC/CNPq – gabireis58@gmail.com

2 Aluna de mestrado do PPGBIOSÚDE – Bolsista CAPES/PROSUP – jejemiri@hotmail.com

3 Professor do curso de Farmácia e do PPGBIOSAÚDE – alexandre.ferraz@ulbra.br

4 Professora do curso de Medicina e do PPGBIOSAÚDE – grivicich@ulbra.br

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CRC) é uma neoplasia maligna que acomete a parede interna ao longo do segmento do intestino grosso (cólon e reto). No Brasil, é estimado para o ano de 2018, 17.380 novos casos de câncer de cólon e reto em homens e de 18.980 em mulheres (INCA, 2018). Muito utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o CRC, o 5-Fluorouracil (5-FU) é um antimetabólito fluoropirimidina análogo de pirimidina com atividade antineoplásica. O tratamento com 5-FU possui limitações, pois sua exposição prolongada pode levar a resistência da célula ao antineoplásico (DE ANGELIS et al., 2006). A resistência a agentes antineoplásicos é considerada como uma das principais causas de tratamentos sem resultados, acometendo 90% de pacientes com CRC metastático. Uma abordagem para superar a resistência focar em um tratamento que busque ser eficaz contra o câncer requer na maioria das vezes uma combinação de agentes terapêuticos capazes de atuar em múltiplas rotas com um mínimo de toxicidade (WANG et al., 2016).

Extratos vegetais possuem diversos compostos químicos que tem o potencial de atuar em diferentes mecanismos de resistência. Esses compostos, muitas vezes isolados de determinadas plantas, possuem propriedades quimiossensibilizantes quando utilizados em conjunto com um agente antineoplásico, podendo restaurar ou até potencializar o efeito antitumoral em células que inicialmente se mostraram resistentes à quimioterapia (WANG, 2013). Possuindo cerca de 30 gêneros e 1150 espécies, a família Clusiaceae engloba árvores, arbustos, ervas de interesse econômico e derivados químicos de interesse farmacêutico e industrial. Em todo o mundo, espécies desta família são utilizadas com fins medicinais, para o tratamento do câncer, controle da obesidade, entre outros. As principais classes de compostos encontrados nesta família são xantonas, cumarinas, biflavonoides e benzofenonas, produzidos pelas plantas principalmente como mecanismo de defesa (FERREIRA et al., 2012; ANHOLETI et al., 2015). A garcinielliptona FC (GFC) é um acilfloroglucinol policíclico poliprenilado que foi isolado a partir do extrato hexânico de sementes da *Platonia insignis* Mart. Este composto tem demonstrado efeito antibacteriano, antioxidante, antidepressivo e antifúngico (DA SILVA et al., 2016). Na busca de um tratamento que consiga ser eficiente, produtos naturais que podem inibir ou induzir morte celular estão atraindo cada vez mais atenção no desenvolvimento novos quimioterapêuticos. Sendo necessário cada vez mais estudos para comprovar a eficácia e segurança desses agentes. O uso de espécies da família Clusiaceae apresentaram resultados positivos em tratamento de diversos tipos de câncer. O GFC, composto isolado das sementes da espécie *Platonia insignis*., é pouco relatado na literatura científica relacionada ao câncer.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico do composto GFC na linhagem celular de adenocarcinoma colorretal HT-29.

METODOLOGIA

Para a obtenção do composto GFC, os frutos da *P. insignis Mart.* foram coletados em Barras, Piauí, Brasil, em março de 2009. O GFC foi isolado pelo Laboratório de Fitoquímica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) a partir do extrato hexânico das sementes secas (JUNIOR et al., 2011).

Foi utilizada a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal HT-29 adquirida da American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA). As células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 contendo L-glutamina 2% (p/v) e soro fetal bovino 10% (v/v), a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e umidade de no mínimo 95%.

Para a avaliação da citotoxicidade do composto GFC, foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT ((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (SKEHAN et al. 1990). Para o ensaio, as células foram tratadas com concentrações seriadas (0 -100 µg/mL) do composto GFC. O antineoplásico 5-fluorouracil (5-FU) foi utilizado como controle positivo. A seguir, o MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado as células por 3 h a 37°C. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan violeta foram solubilizados em 200 µL de DMSO. A leitura do ensaio foi realizada em um leitor de microplacas (Multiskan, UNISCIENCE), em densidade ótica de 540 nm. A partir destes dados, foram obtidos os valores de IC₅₀, isto é, a concentração do composto necessária para inibir 50% do crescimento celular, respectivamente, quando comparada aos controles sem tratamento.

A distribuição das células nas fases do ciclo celular após tratamento por 24 h foi determinada por citometria de fluxo nas células marcadas com iodeto de propídio (NICOLETTI et al., 1991). Para isto, após tratamento as células foram lavadas e fixadas em etanol 70%. Após, foram centrifugadas e tratadas com solução contendo citrato de sódio 3,4 µM, iodeto de propídio 20 µg/mL e RNase A 100 µg/mL por 30 min, na ausência de luz. A análise foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. Foram analisados 30.000 eventos. Os resultados foram expressos em percentual de células por fase do ciclo celular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da citotoxicidade foi utilizada para determinar a dose de inibição de 50% do crescimento celular (IC₅₀) para os tratamentos por 24, 48 e 72 h (Tabela 1). Nossos

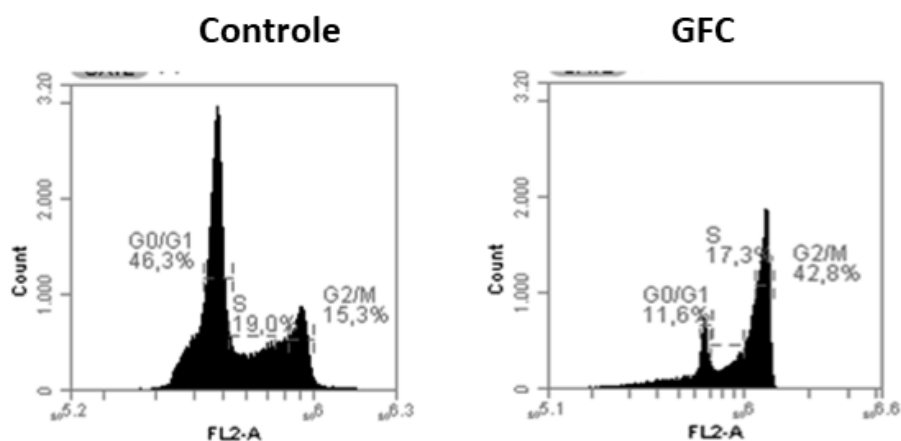
resultados mostraram IC_{50} de $7,9 \pm 0,2$; $10,6 \pm 1,1$ e $6,0 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$ nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente. Estudos publicados utilizando o GFC mostraram inibição do crescimento celular em HEP-2 e NCI-H-292 correspondendo a $77,8 \pm 6,9\%$ e $88,2 \pm 0,7\%$ (JUNIOR *et al.*, 2012). Vale ressaltar que os valores de IC_{50} do GFC estão próximos aos valores do antineoplásico 5-FU, sugerindo que este composto é um bom candidato a agente antineoplásico.

Tabela 1: Valores de IC_{50} na linhagem celular de adenocarcinoma colorretal HT-29 após tratamento por 24 h, 48 h e 72 h com GFC e 5-FU.

	GFC	5-FU
24 h	$7,9 \pm 0,2$	$8,5 \pm 2,1$
48 h	$10,6 \pm 1,1$	$7,5 \pm 1,1$
72 h	$6,0 \pm 1,1$	$17,8 \pm 1,5$

Após 24 h de tratamento, foi observada uma diferença significativa nas fases do ciclo celular ao comparar o GFC com o controle não tratado. O GFC induziu um aumento de 2,7 vezes no número de células na fase G2/M (Figura 1) quando comparado com o controle. Este bloqueio do ciclo celular na fase G2/M está associado com fragmentação do DNA e interrupção da replicação, o que pode levar a célula à morte por apoptose (SHEN *et al.*, 2014). Neste sentido, foi demonstrado que o GFC causou um significativo aumento de indução de apoptose na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 (WU *et al.*, 2008).

Figura 1: Efeito do tratamento com GFC sobre a distribuição das células nas fases do ciclo celular da linhagem celular HT-29.



CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o GFC é citotóxico na linhagem celular de adenocarcinoma colorretal HT-29 e que este efeito está associado com bloqueio na fase G2/M do ciclo celular.

REFERÊNCIAS

ANHOLETI, M.C.; DE PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. Chemosystematic aspects of polyisoprenylated benzophenones from the genus *Clusia*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 289–301, 2015.

DA SILVA, A.P.; MEDEIROS, S.G.; SOUSA, A.M.; LOPES, L.D.S.; DAVID, J.M.; DA COSTA JUNIOR, J.S. Pre-clinical toxicology of garcinielliptone FC, a tautomeric pair of polyprenylated benzophenone, isolated from *Platonia insignis* Mart seeds. **Phytomedicine**, v. 23, p. 477–482, 2016.

DE ANGELIS, P.M.; SVENDSRUD, D.H.; KRAVIK, K.L.; STOKKE, T. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. **Molecular Cancer**, v. 5, p. 5-20, 2006.

FERREIRA, R.O.; DE CARVALHO, M.G.; DA SILVA, T.M.S. Ocorrência de biflavonoides em clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. **Química Nova**, v. 35, p. 2271–2277, 2012.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. Acesso em 01 junho. 2018.

JUNIOR, J.S.C.; DE ALMEIDA, A.A.C.; FERRAZ, A.B.F; ROSSATTO, R.R.; SILVA, T.G., SILVA, P.B.N.; MILITÃO, G.C.G.; CITÓ, A.M.D.G.L.; SANTANA, L.C.L.R., CARVALHO, F.A.D.A.C.; FREITAS, R.M. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural Product Research**, v. 27, p. 470-474, 2012.

JUNIOR, J.S.C.; FERRAZ, A.B.F.; FILHO, B.A.B.; FEITOSA, C.M.; CITO, A.M.G.L.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidant effects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 293–299, 2011.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, .G; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunology Methods**, v.139, p. 271-279, 1991.

SHEN, W.; HU, J.A.; ZHENG, J.S. Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. **Journal of International Medical Research**, v. 41, p. 164-172, 2014.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. New colorimetric assay for anticancer drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 1107-1112, 1990.

WANG, Y.; YU, J.; CUI, R.; LIN, J.; DING, X. Curcumin in Treating Breast Cancer: A Review. **Journal of Laboratory Automation**, v. 21, p. 723–731. 2016.

WU, C.C.; LU, Y.H.; WEI, B.L.; YANG, S.C; WON, S.J; LIN, C.N., Phloroglucinols with Prooxidant Activity from *Garcinia subelíptica*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 246-250. 2008.