



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

EXTRATO DE FRUTO DO ARATICUM (*ANNONA CRASSIFLORA*) REDUZ A PROLIFERAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BÓCA ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DO CICLO CELULAR

Autores: TAYSLLA BARBOSA MOREIRA, UGO BORGES PINHEIRO, GUILHERME VELOSO RAMOS, LÍLIAN MENDE BORBUREMA CANGUSSU, MARILÉIA CHAVES ANDRADE, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, LUCYANA CORNCEIÇÃO FARIAS

Introdução

O Araticum (*Annona crassiflora*) é um fruto típico do cerrado brasileiro e ocorre na região do norte de Minas Gerais (EGYDIO, 2013). Algumas análises fitoquímicas foram realizadas com a polpa do fruto e resultaram na identificação de substâncias bioativas isoladas a partir do extrato orgânico. Essas substâncias apresentaram atividade anti-oxidante (BRAGA FILHO, 2014), demonstrando o potencial terapêutico dessa espécie (ROESLER, 2011). Os efeitos do extrato bruto, assim como as frações do Araticum sobre o fenótipo das células do carcinoma epidermoide de boca (CEB), ainda não são conhecidos. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar o potencial antineoplásico de frações do Araticum sobre comportamento *in vitro* de células de CEB, com ênfase na atividade proliferativa e modulação do ciclo celular.

Material e métodos

A. Preparação dos extratos

O fruto *Annona crassiflora* foi colhido na região do cerrado na cidade de Montes Claros, e foi feita identificação da espécie por taxonomista. A polpa do fruto foi separada e, posteriormente, liofilizada. O produto liofilizado foi triturado, pesado e submerso em etanol 99% em recipientes de vidro âmbar, conservados em local escuro e seco por 10 dias. Após esse período, o extrato foi reduzido no rotaevaporador. Posteriormente, foi realizada a filtração em funil de vidro, com papel de filtro qualitativo. O extrato bruto foi levado à estufa de circulação forçada de ar a $40^{\circ}\text{C} \pm 5$ até a completa evaporação do solvente.

B. Fracionamento do extrato bruto

Para o fracionamento do extrato bruto, este passou por ciclos em diferentes solventes na seguinte ordem: Hexano, diclorometano, Acetato de Etila e Butanol, objetivando separar as moléculas com diferentes polaridades. Foi colocado 1g. de extrato bruto em um recipiente para maceração com o primeiro solvente (30 ml de Hexano) e macerado por 10 minutos. Após esse tempo, o sobrenadante foi colocado em uma placa de vidro. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes atingindo 90 ml de sobrenadante. O sobrenadante foi acondicionado em placa de vidro e colocado na estufa de secagem e circulação a 40°C para evaporação. O mesmo procedimento usado para o solvente Hexano foi usado também para os outros solventes usando a mesma massa de extrato bruto. Cada fração foi deixada para desidratar por 24h. Depois desse período, foi feita a raspagem das placas de vidro para pesar a fração desidratada em tubos tipo eppendorf.

C. Diluição da fração para ensaios fenotípicos

As frações foram diluídas no veículo DMSO e posteriormente em meio de cultura DMEM/F12 (Gibco, USA), obtendo-se as concentrações 10 $\mu\text{g/ml}$ e 100 $\mu\text{g/ml}$. As concentrações foram obtidas a partir da diluição seriada da solução estoque em DMSO 100%, sendo que a concentração do veículo, em cada diluição, foi inferior a 0,1%, visando evitar a toxicidade das células pelo DMSO.

D. Cultivo celular

Células da linhagem celular imortalizadas de CEB, SCC-9 (ATCC Cell Bank, USA), foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 contendo 10% de soro fetal bovino, 400ng/ml de hidrocortisona e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco, USA), mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO_2 . Tal linhagem foi tratada com a fração butanol do fruto, nas concentrações 10 $\mu\text{g/ml}$ e 100 $\mu\text{g/ml}$, durante 24h. Tal fração foi selecionada para teste em relação às demais, por apresentar maior solubilidade no veículo DMSO. Anteriormente, foi realizada uma curva dose-resposta para estabelecer a concentração da fração e o tempo de tratamento.

E. Ensaio de proliferação celular

Em cinco ensaios independentes, os experimentos foram realizados com células SCC-9 em DMEM (10%) e DMSO (1%) a uma concentração de 10⁴ células/mL e cultivadas por 24 horas para estabelecer uma monocamada de células aderentes. Após isso, foram diferenciadas em três grupos: controle, tratamento com fração de Araticum e tratamento com fração de Araticum + DMSO. Após tratamentos, foi mensurada a viabilidade celular através do método de contagem de células por exclusão pelo corante azul trypan.

F. Análise do ciclo celular

O ciclo celular foi avaliado pela quantificação do DNA total, nas diferentes fases G₀/G₁, S e G₂/M. Após os tratamentos experimentais, as células foram tripsinizadas e os pellets foram fixados em etanol 70% (v:v), durante 2 h a 4°C. Em seguida, foram lavadas com solução tampão PBS 1X e incubadas com 50 µg/mL RNase A por 30 min a 37°C. O material genético foi marcado com 50 µg/mL PI por 30 min à temperatura ambiente (Liu *et al.*, 2011). Um mínimo de 10.000 eventos foi analisado para cada amostra, em um citômetro de Fluxo Beckman Coulter. As porcentagens médias de células nas diferentes fases do ciclo foram determinadas através do software Kaluza (Beckman Coulter, USA). Somente as células que apresentaram conteúdo de DNA entre 2n-4n foram consideradas na análise do ciclo celular.

G. Análises estatísticas

Os resultados foram tabulados e analisados no software estatístico SPSS®, versão 18.0, para Windows. Foi utilizado o teste Anova One-Way, com nível de significância p<0,05.

Resultados e discussão

A. A fração butanol do Araticum reduz a proliferação de células de CEB

A proliferação das células SCC-9 (Fig. 1A) tratadas com 10 µg/mL e 100 µg/mL da fração butanol demonstrou um comportamento fenotípico distinto ao grupo não tratado. Os grupos tratados com a fração butanol com tais concentrações apresentaram uma menor frequência de proliferação celular, quando comparado ao grupo não tratado (controles DMEM e DMSO). Esses resultados sugerem que componentes bioativos presentes nessa fração do Araticum pode interferir sobre o fenótipo proliferativo de células de CEB.

B. A fração butanol do Araticum alterou a população de células nas diferentes fases do ciclo celular

A análise do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular mostrou que o extrato do Araticum, especialmente na maior concentração 100 µg/mL, promoveu um aumento do número de células em G₀/G₁, resultado este identificado através do aumento significativo da contagem de eventos nessa fase. Além disso, notou-se uma evidente redução da fase de síntese promovida pelas substâncias presentes no extrato butanólico. A fase G₂ não foi modificada pelo tratamento nesta concentração (Fig. 1B). Tais resultados apontaram para um efeito antineoplásico potencial de substâncias presentes no fruto do Araticum, exercendo uma modulação do fenótipo neoplásico proliferativo das células, através da promoção da parada do ciclo e redução da síntese de material genético, necessário à multiplicação celular.

Considerações finais

O estudo mostrou evidências iniciais da ação antineoplásica do fruto do Araticum sobre o comportamento fenotípico de células de carcinoma epidermoide de boca. A fração butanol do Araticum reduziu a proliferação das células neoplásicas e levou ao aumento do número de células nas fases iniciais do ciclo celular, promovendo, assim, o controle da população de células neoplásicas. Análises experimentais de modelos de estudo *in vivo* e ensaios moleculares necessitam ser realizados a fim de corroborar tais resultados. Além disso, as perspectivas para esse estudo, envolve a identificação dos possíveis compostos bioativos presentes no fruto.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brasil. Os autores também agradecem à Universidade Estadual de Montes Claros.



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

Referências bibliográficas

EGYDIO, A.P.M.; VALVASSOURA, T.A.; SANTOS, D.Y.A.C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annonacassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46, 145–151, 2013.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(1), 93-100, 2011.

BRAGA-FILHO, J.R.; NAVES, R.V.; CHAVES, L.J.; PIRES, L.L.; MAZON, L.T. Caracterização física e físico-química de frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). *Bioscience Journal*, 30(1), 16-24, 2014.

CORRÊA, S.C.; CLERICI, M.T.P.S.; GARCIA, J. S.; FERREIRA, E. B.; EBERLIN, M.N.; AZEVEDO, L. Evaluation of dehydrated marolo (*Annonacassiflora*) flour and carpels by freeze-drying and convective hot-air drying. *Food Research International*, 44(7), 2385–239, 2011.

COTA, L.G.; VIEIRA, F. A.; MELO JÚNIOR, A. F.; BRANDÃO, M. M. SANTANA, K.N.O.; GUEDES, M.L.; OLIVEIRA, D.A. Genetic diversity of *Annonacassiflora* (Annonaceae) in northern Minas Gerais State. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 2172-2180, 2011.

Chan, S. W. *et al.* A role for taz in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res*, v.68, n.8, p.2592-2598, 2008.

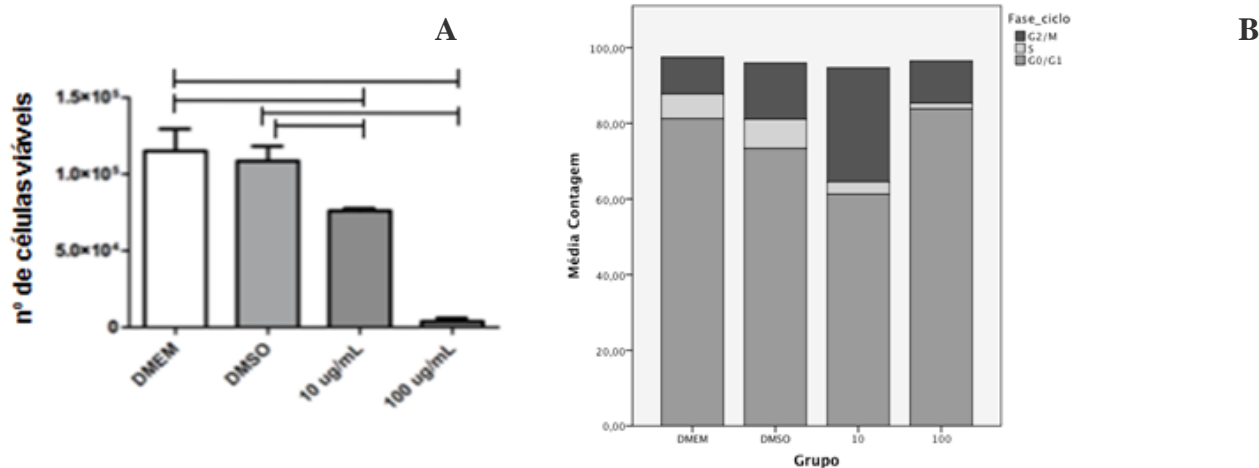


Figura 1. Alterações na proliferação celular, representada pelo número de células viáveis (A) e no perfil quantitativo de células nas diferentes fases do ciclo celular, em células SCC9 tratadas com 10 e 100 µg/mL da fração butanol do Araticum, por 24h. Grupos experimentais: DMEM (células livres de tratamento, em meio de cultura), DMSO (células livres de tratamento em meio de cultura e veículo de diluição DMSO 0,1%); Grupo 10 µg/mL (células tratadas com 10 µg/mL da fração butanol do Araticum); Grupo 100 µg/mL (células tratadas com 100 µg/mL da fração butanol do Araticum). Teste Anova One-Way; Barras horizontais indicam significância estatística: $p < 0,005$.



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X