

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA *Punica granatum* L. SOBRE CÉLULAS TUMORAIS

OLIVEIRA, Ligianne Pereira¹; PINHEIRO, Renata Canuto²; VALADARES, Marize Campos³

Palavras-chave: *Punica granatum* L.; romã; Azul de Trypan; MTT

1. INTRODUÇÃO

A grande incidência de câncer em todo mundo faz com que cada vez mais aumente a busca de pesquisas e terapias, mais seguras e eficazes, para prevenção e combate do mesmo. Apesar dos vários esforços despendidos, o sucesso no tratamento de tumores tem se mostrado discreto, devido ao grau de agressividade da doença e os mecanismos de escape das células neoplásicas, e principalmente pela toxicidade medular causada pelos agentes anti-neoplásicos devido a ausência de seletividade destes para as células neoplásicas, o que limita suas doses fazendo com que muitas vezes elas sejam incapazes de eliminar todas as células tumorais (RAFFERTY *et al.*, 1996). Estudos sobre fitoterápicos na busca de substâncias bioativas de origem natural vêm despertando interesse da comunidade científica e vários trabalhos têm sido publicados confirmando atividades farmacológicas de ervas de uso secular e empírico pela população, por desempenhar papel fundamental na prevenção de patologias. Estas informações demonstram, inquestionavelmente, a importância da pesquisa científica na identificação da atividade farmacológica e mecanismos de ação de plantas e/ou seus extratos, para novas descobertas em áreas como oncologia, imunoterapia, entre outras. Sendo assim, nos propomos a estudar a citotoxicidade do extrato da folha e do fruto da *Punica granatum* sobre o modelo experimental do Tumor ascítico de Ehrlich, que é bastante vantajoso frente a outros modelos tumorais por apresentar inespecificidade diante das diferentes linhagens murinas, ser facilmente transplantável, com porcentagem de “pega” de até 100% e permitir a utilização de diferentes vias de inoculação para a administração das células tumorais.

2. METODOLOGIA

2.1 - Obtenção do extrato

O material botânico foi oriundo do horto da Faculdade de farmácia e o extrato preparado de acordo com a Farmacopéia Brasileira.

2.2 - Ensaio *in vitro*

Nos ensaios *in vitro* utilizamos células ascítica de Ehrlich, que foram coletadas da cavidade intraperitoneal de camundongos Swiss. Para avaliar a citotoxicidade, as células foram semeadas (2×10^6 cels/ml), em triplicata, em placa de 96 poços e incubadas durante 24 e 48 horas, em estufa úmida, com 5% de CO₂ no ar, com diferentes concentrações (0,062 a 3,125mg/ml) do extrato alcoólico da folha e do fruto da PG.

2.2.1 - Avaliação da citotoxicidade pelo método de viabilidade por azul de trypan Após o período de incubação uma alíquota de 20 µl da suspensão de células foi retirada e diluída em 180 µl de Azul de Trypan (0,2%, Sigma ®). As células foram observadas por suas alterações morfológicas e contadas em Câmara de Neubauer. As células viáveis, que excluíram este corante, possuíam um aspecto translúcido e as células mortas apresentavam a coloração arroxeadas.

2.2.2 - Avaliação da citotoxicidade do extrato de PG pelo método de redução do tetrazolium (MTT)

Após o período de incubação foram adicionados 10 μ l da solução de MTT em cada poço e a cultura foi incubada por mais 4 horas. Em seguida retirou-se o sobrenadante (meio de cultura) e 80 μ l de Dimetil Sulfoxido (DMSO, Merck) foi adicionado a cada poço para solubilização dos cristais azuis-escuro de formazan formados. Os cristais foram homogeneizados cuidadosamente por 10 minutos e em seguida efetuou-se a leitura em aparelho de ELISA a 570 nm e a citotoxicidade celular dos extratos em estudo foi calculada da seguinte maneira: Células viáveis = Absorbância por well/ Média da Absorbância do controle x 100.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 - Avaliação da citotoxicidade pelo método de viabilidade por azul de trypan

Utilizando o método de viabilidade por azul de trypan, notou-se que as diferentes concentrações da planta produziu um efeito citotóxico concentração-dependente, conforme apresentado na Figura 1A. A citotoxicidade é extrema nas doses de 3,125 e 1,56 mg/ml, ocasionando 100% de células mortas em relação ao controle, independente do período de incubação. A concentração de 0,39 mg/ml apresentou 38,18% de células vivas no período de 24h e apenas células mortas no período de 48h. Em 0,25 e 0,125 mg/ml foi analisada a presença respectiva de 64,37% e 82,22% de células viáveis no período de incubação de 24h, sendo que 38,41% (0,25mg/ml) e 38,22% (0,125mg/ml) de células vivas foram observadas na incubação por 48h. Na concentração de 0,062 mg/ml restaram 59,85% de células vivas no período de 24h, sendo que em 48h foi observado 38,69% de células vivas. Maiores estudos são necessários para o estabelecimento preciso da CL_{50} . Um perfil semelhante de resposta foi observado com a exposição de células do Tumor ascítico de Ehrlich a diferentes concentrações do extrato bruto do fruto da Pg (Figura 1B).

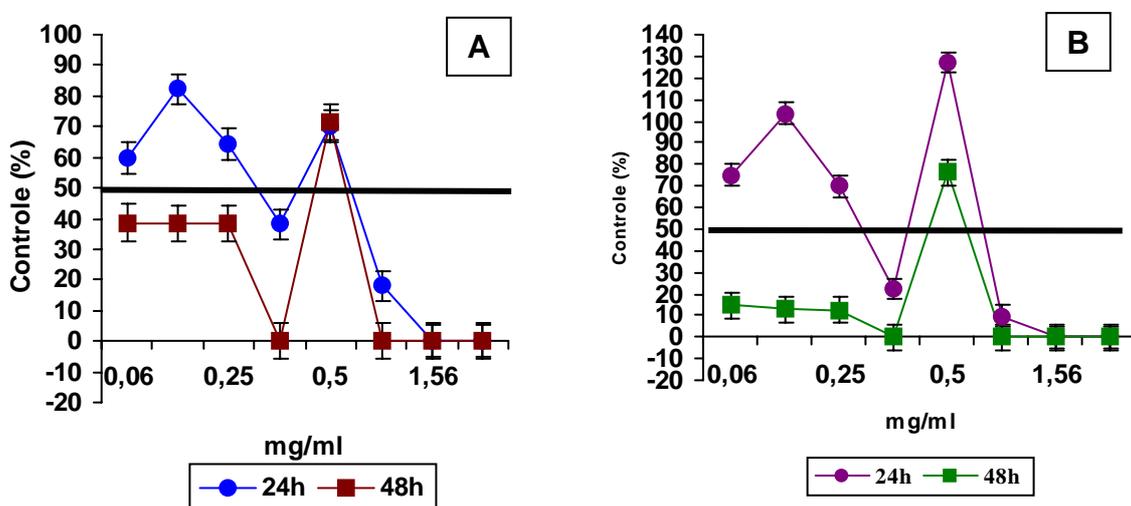


Figura 1- Viabilidade celular de células ascíticas do Tumor de Ehrlich após 24 e 48 h de exposição a diferentes concentrações do extrato da folha (A) e do fruto (B) de PG (0,062 a 3,125 mg/ml) pelo método de azul de trypan. Cada ponto representa a média da triplicata. A barra horizontal representa 50% de morte celular (CL_{50}).

3.2 - Avaliação da citotoxicidade do extrato de PG pelo método de redução do tetrazolium (MTT)

Através do método de redução do MTT várias concentrações do extrato alcoólico da folha de *Punica granatum* em culturas de células com Tumor ascítico de Ehrlich, foram testadas num período de incubação de 48h, e notou-se que as diferentes concentrações da planta produziu

um efeito citotóxico dose-dependente. As doses de 3,125 e 1,56 mg/ml ocasionaram respectivamente 84,53% e 83,69% de células com atividade mitocondrial em relação ao controle. Nas concentrações de 0,78 e 0,5 mg/ml observou-se respectivamente 81,95% e 88,94% de células viáveis. A concentração de 0,39 mg/ml apresentou 92,41% de células viáveis. Em 0,25 e 0,125 mg/ml foi analisada a presença respectiva de 95,02% e 72,12% de células vivas. Na concentração de 0,062 mg/ml restaram 79,98% de células vivas (Figura 2A). A cultura de células com o extrato do fruto, em um período de incubação de 24 apresentou os seguintes resultados pelo método de redução do MTT: nas maiores doses empregadas aproximadamente 80% das células sobreviveram em relação ao controle. Nas concentrações de 0,78 e 0,5 mg/ml observou-se 75,75% e 70,88% de células viáveis, respectivamente. A concentração de 0,39 mg/ml apresentou 97,50% de células vivas. Nas menores concentrações não se observou atividade citotóxica (Figura 2B).

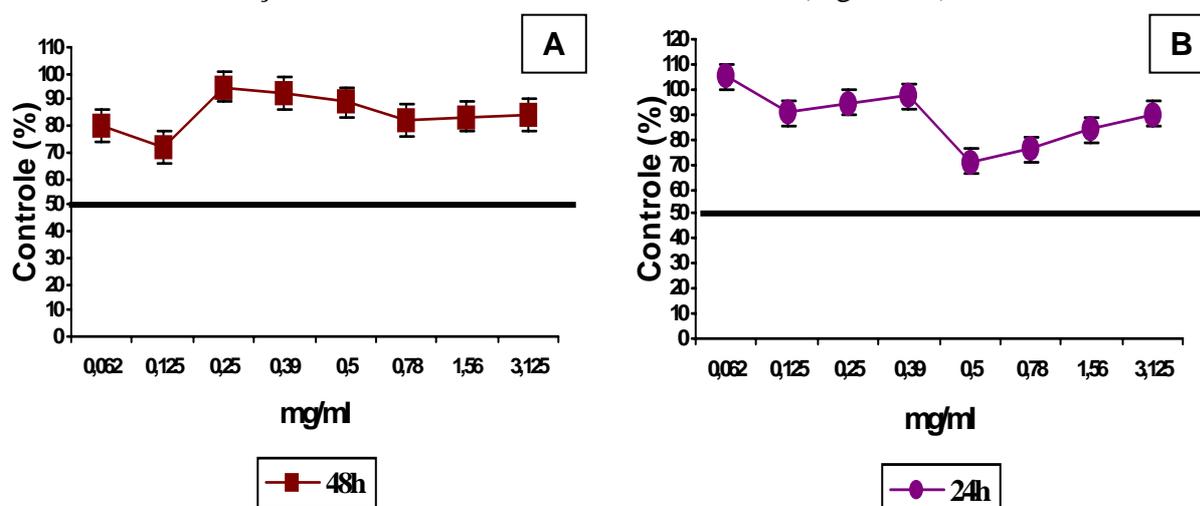


Figura 2- Viabilidade celular de células ascíticas do Tumor de Ehrlich após 48 h de exposição a diferentes concentrações do extrato da folha (A) e do fruto (B) de PG (0,062 a 3,125 mg/ml) pelo método de redução do MTT. Cada ponto representa a média da triplicata. A barra horizontal representa 50% de morte celular (CL₅₀%).

4 - CONCLUSÕES

Diante dos dados apresentados, podemos concluir que o EPG possui um efeito citotóxico sobre as células do Tumor ascítico de Ehrlich. Este efeito se apresentou de forma concentração-dependente. Maiores estudos deverão ser realizados com diferentes doses para confirmação do efeito citotóxico em outras linhagem tumorais e encontrarmos a concentração letal para 50% das células (CL₅₀%).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KIM N.D.; MEHTA R.; YU W.P. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer *Breast Cancer Research And Treatment* 71 (3): 203-217 Fevereiro, 2002.

RAFFERTY, J.A.; HICKSON, I.; LASHFORD, L.S. Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. *Cancer Metastasis Rev*, 15: 365, 1996.

Fonte de Financiamento: CNPQ

¹ Voluntária de iniciação científica. Faculdade de Farmácia – NEPET-UFG - Núcleo de Estudos e Pesquisas Toxicológicas, ligianne@gmail.com

² Voluntária de iniciação científica. Faculdade de Farmácia – NEPET-UFG - Núcleo de Estudos e Pesquisas Toxicológicas, canutorenata@yahoo.com.br

³ Orientadora/Faculdade de Farmácia/UFG, NEPET-UFG, marizecv@farmacia.ufg.br