

CONIC SEMESP

15º Congresso Nacional de Iniciação Científica

TÍTULO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE SYZYGIUM JAMBOLANUM (EBHSJ) EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA (JURKAT)

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: FARMÁCIA

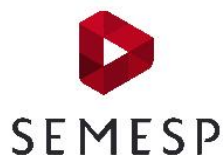
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

AUTOR(ES): KATIA REGINA SILVA LIMA

ORIENTADOR(ES): CARLOS ROCHA OLIVEIRA

COLABORADOR(ES): CAUE SANTOS LIMA JUNIOR

Realização:



Apoio:



Avaliação do potencial citotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Syzygium jambolanum* (EBHSJ) em células de leucemia linfocítica aguda (Jurkat).

Lima K¹, Lima CS², Oliveira CR^{1,2}.

- 1. Laboratório de fitofarmacologia e sinalização celular da Universidade Anhembi Morumbi.**
- 2. Laboratório de sinalização celular e morte do Instituto Nacional de Farmacologia- UNIFESP**

1. RESUMO

Syzygium jambolanum é um vegetal no qual apresenta grande variedade de compostos bioativos presentes em diferentes partes do vegetal, suas folhas são ricas em taninos e saponinas, seus frutos em antocianinas, o qual diferentes trabalhos da literatura apresentam propriedade farmacológica distintas incluindo atividade antioxidante, atividade antiangiogênica e atividade antitumoral.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Syzygium jambolanum* (EBHSJ) em linhagem celular de leucemia linfocítica aguda Jurkat. Para isso foi utilizado o método de exclusão por incorporação do corante azul de tripano, avaliação da fração sub-g1 por marcação com iodeto de propídeo e avaliação do potencial de membrana mitocondrial por marcação com TMRE (*Tetramethylrhodamine, ethyl ester*). Os resultados obtidos mostraram que o EBHSJ reduz a viabilidade celular de modo concentração-dependente com mobilização mitocondrial em células leucemia linfocítica aguda (Jurkat).

2. INTRODUÇÃO

A grande diversidade de espécies vegetais com potencial terapêutico no ecossistema brasileiro fornece vários compostos para estudos específicos na pesquisa de novos medicamentos contra doenças diferentes, inclusive o câncer. Um exemplo clássico foi à descoberta dos alcaloides de vinca, a vinblastina e vincristina,

que foram isoladas a partir de *Catharanthus roseus* e utilizadas na prática médica de agentes antineoplásicos (CRAGG et al., 2005).

O uso de compostos de origem vegetal como protótipos de novas drogas tem uma importância histórica e econômica. Alguns extratos de plantas foram definidos como eficaz no tratamento das neoplasias, cuja ação é atribuída a um efeito adicional ou sinérgica de compostos presentes no extrato (LI et al., 2000).

O Jambolão (*Syzygium jambolanum*) é uma planta da família Myrtaceae, oriunda da Índia oriental, suas folhas são ricas em taninos e saponinas com mecanismo de ação antimicrobiana, seus frutos são ricos em antocianinas, a qual tem apresentado diferentes propriedades farmacológicas promissoras, dentre elas estão se destacam ações antioxidantes, mobilização do ciclo celular, propriedade anti-angiogênica e indutor apoptótico com possível mobilização da via autofágica (LAZZÉ et al.,2004; BAGCHI et al.,2004; LOGUERCIO et al.,2005; SOARES et al.,2008).

Poucos estudos têm relatado a atividade citotóxica de compostos isolados ou extratos do fruto ou planta de gênero *Syzygium*. Esse estudo tem com objetivo avaliar o potencial citotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Syzygium jambolanum* (EBHSJ) em linhagem celular de leucemia linfocítica aguda (Jurkat).

Essa linhagem foi estabelecida a partir de um adolescente com 14 anos de idade diagnóstica com leucemia linfocítica aguda com expressão gênica de IL-2 e tem por característica o bloqueio no mecanismo de morte celular e proliferação desordenada (ATCC, 2014).

3. OBJETIVOS

Avaliar a potencial citotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Syzygium jambolanum* (EBHSJ) em linhagem celular de leucemia linfocítica aguda Jurkart.

4. METODOLOGIA

Este trabalho de iniciação científica foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Anhembi Morumbi – UAM. O extrato bruto hidroalcoólico de *Syzygium jambolanum* (EBHSJ) foi cedido gentilmente pelo laboratório Almeida Prado. As células foram cedidas gentilmente pela Prof. Dra. Claudia Bincoletto Trindade, professora adjunta do departamento de farmacologia da Universidade

Federal de São Paulo (UNIFESP) e cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%), mantida em estufa úmida a 37° C e 5% de CO₂.

As células de leucemia linfocítica aguda foram tratadas com EBH de *Syzygium jambolanum* com concentrações em seriadas de 10, 25 e 50 µg/mL por 24 horas e o número de células viáveis foi determinado por incubação ao corante azul de tripano (diluição 1:2) e quantificadas por microscopia óptica em câmara hematocimétrica.

Pelo mesmo tratamento, as células foram submetidas à marcação com o fluoróforo iodeto de propídeo (PI), o qual tem por característica intercalarem-se as bases nitrogenadas do DNA e induzir fluorescência permitindo a identificação das diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo (RICCARDI et al., 2006). Esse ensaio também nos permitiu avaliar e quantificar as células que saíram da fase de ciclo (fase G0/G1, fase G2/M e fase S) e possivelmente entraram em processo de morte, denominado de fração sub-g1. Posteriormente as células tratadas foram submetidas a marcação com o fluoróforo TMRE (*tetramethylrhodamine, ethyl ester*), o qual tem por característica a ligar-se as mitocôndrias ativas e nos permite detectar a permeabilidade mitocondrial despolarização da membrana.

5. DESENVOLVIMENTO

O fruto do jambolão (*Syzygium jambolanum*) é rico em antocianina, o qual é responsável pela coloração azul arroxeada do fruto e tem sido relatado como potente antioxidante (LUZIA; JORGE, 2009).

Outro potencial terapêutico do extrato hidroalcoólico de *Syzygium Jambolanum* é relatado por alguns trabalhos na literatura como, por exemplo, o trabalho de Maiti e colaboradores (2013) o qual utilizando a tintura mãe desse composto observou-se que uma melhora no metabolismo de carboidratos e lipídio de animais diabéticos, submetidos à streptozotocina, uma droga clássica indutora de diabetes por induzir apoptose em células β do pâncreas.

Diante disso nosso trabalho teve por objetivo avaliar o potencial citotóxico do EBHSJ em células de leucemia linfocítica aguda, visto que as células leucêmicas dependem do estresse oxidativo para sua proliferação e virulência (REED; PELLECCIA, 2005). Além de apresentarem resistência nos mecanismos intrínsecos de morte celular e diferenciação.

Quanto a morte celular, alguns mecanismos chaves podem desencadear esse processo por duas vias principais, a via extrínseca ou a via intrínseca, a primeira é dependente da participação dos receptores de morte presentes na membrana celular, a segunda é dependente da partição das mitocôndrias (GARRIDO et al., 2006). Dentre as muitas funções mitocondriais, como homeostase intracelular de cálcio, fosforilação oxidativa e metabolismo intracelular (GALLUZZI et al., 20012). As mitocôndrias participam ativamente dos mecanismos intrínsecos de morte celular programada, a qual é responsável pela liberação de fatores conclusivos para esse evento (GARRIDO et al., 2006).

Nesse trabalho nós podemos avaliar o potencial citotóxico nessas células e a possível via de morte celular envolvida. Assim os resultados de citotoxicidade realizados pelo método de exclusão por incorporação do azul de tripano, apresenta que o EBHSJ possui potencial citotóxico em linhagem de leucemia linfocítica aguda (Jurkat) de modo que reduz a viabilidade celular à medida que aumenta a concentração do extrato (concentração-dependente).

Ao avaliarmos a ação desse extrato sobre as fases do ciclo celular, podemos observar que não houve modulação das diferentes fases do ciclo celular, e é possível observar aumento da fração sub-g1, a qual é um forte indicativo do potencial citotóxico de EBHSJ (RICCARDI et al., 2006).

Como descrito anteriormente que o mecanismo de morte celular pode ocorrer por duas vias convergentes, a via extrínseca e intrínseca de apoptose, seguimos com o objetivo de avaliar se o potencial citotóxico de EBHSJ recruta a sinalização mitocondrial para esse evento; para isso avaliamos o potencial de membrana mitocondrial, o qual é indicativo de colapso mitocondrial por meio da formação de poros e ocorre à redução potencial de membrana e permite a liberação de fatores pró-apoptóticos. Nossos resultados apresentaram que o EBHSJ é capaz induz morte celular em células de leucemia linfocítica aguda (Figura 1 e 2) por meio da participação mitocondrial, sugerindo assim um possível processo apoptótico por via intrínseca. (figura 3).

6. RESULTADOS

6.1. O extrato bruto hidroalcoólico de *S. Jambolanum* reduz a viabilidade celular de células de leucemia linfocítica aguda (Jurkat).

A avaliação da citotoxicidade de EHB de *S. jambolanum* pelo método de exclusão por incorporação do corante azul de tripano, apresenta a menor concentração utilizada (10µg/mL) apresenta resultado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle (sem tratamento); ao analisarmos demais concentrações utilizadas, observamos que ocorre uma redução da viabilidade celular de forma gradual, assim sugerindo que o potencial citotóxico de EBHSJ é concentração dependente. (Fig1).

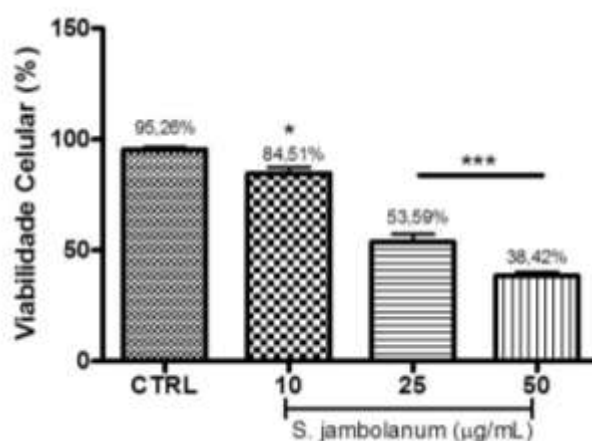


Figura 1. Determinação de atividade citotóxica de EBH *S. jambolanum* (10- 50 µg/mL) em células Jurkat.

Ensaio realizado pelo teste de azul de tripano em células Jurkat para determinação do potencial citotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *S. jambolanum* em células de leucemia linfocítica aguda após 24 horas de tratamento. Foram realizados dois ensaios independentes em triplicatas. Resultados expressos em média de porcentagem de viabilidade celular mais média de erro padrão (\pm EPM). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle sem tratamento (ANOVA; teste a posteriori de Tukey).

6.2. O extrato bruto hidroalcoólico de *S. Jambolanum* induz aumento da fração sub-g1 em células Jurkat.

A avaliação da mobilização das fases do ciclo celular sob o tratamento de EBHSJ após vinte e quatro horas de tratamento, apresenta que esse composto não foi capaz de mobilizar as diferentes fases do ciclo e sim induzir aumento da fração sub-

g1, a qual corrobora com os dados anteriores obtidos pelo método com azul de tripano, indicando também potencial citotóxico concentração-dependente, de forma que é possível observar a elevação dessa fase de forma significativa em relação ao grupo controle sob tais concentrações (Figura 2).

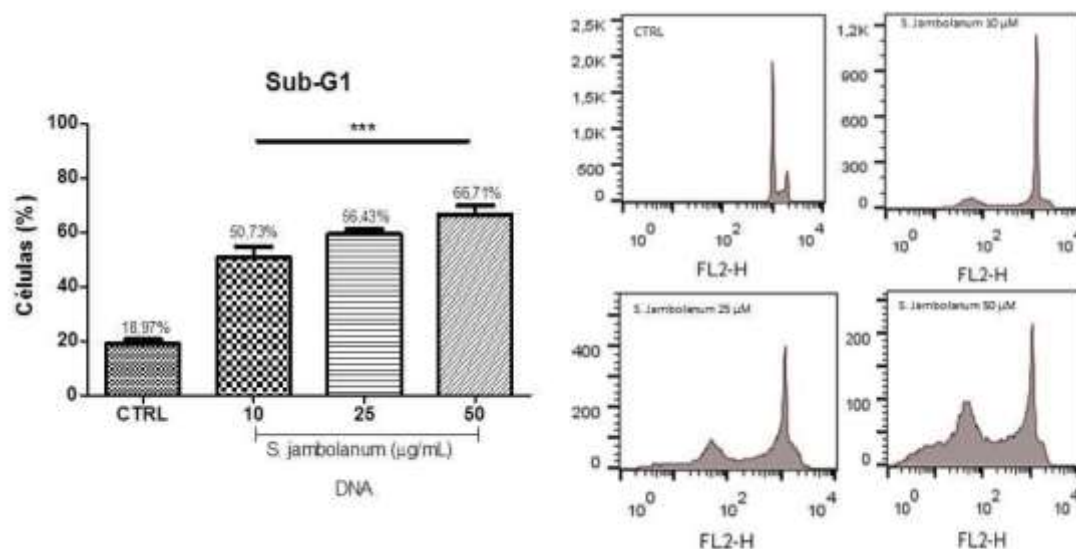


Figura 2. Ações citotóxicas do EBH de *S. jambolanum* sobre as células de leucemia linfocítica aguda (Jurkat).

Ensaio realizado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo para verificação dos efeitos citotóxicos de EBH de *S. jambolanum* (10 a 50 µg/mL) por meio de aumento da fração sub-G1 após o tratamento por 24 horas. Os dados foram obtidos através do programa Cell Quest e a análise dos dados foi realizada no programa FlowJo™ v.7.6.1, Tree Star, Inc. Análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 5. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata por grupo estudado (\pm EPM). *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle sem tratamento, # $p < 0,05$ (ANOVA; teste a posteriori de Tukey).

6.3. O extrato bruto hidroalcoólico de *S. jambolanum* induz redução do potencial de membrana mitocondrial.

Ao analisarmos o resultado obtido por marcação com o TMRE, observamos que o EBSJ é capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial em células de leucemia linfocítica aguda (Jurkat) após doze horas de tratamento sob a concentração de 25 µg/mL, de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Nesse ensaio nós utilizamos o FCCP (*carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*) como controle positivo experimental, o qual é um

um ionóforo desacoplador da fosforilação oxidativa, capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial de forma assídua.

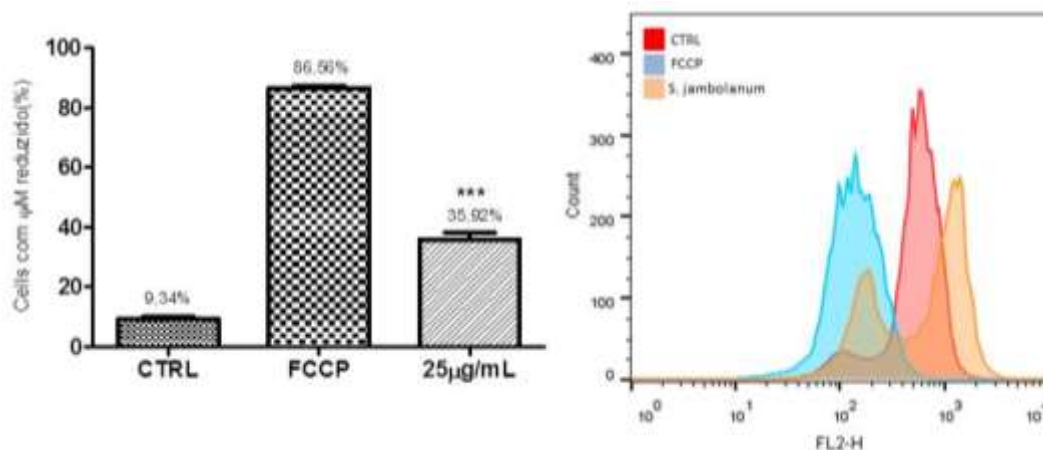


Figura 3. Participação da via mitocondrial no processo de morte celular induzida pelo EBH de *S. jambolanum* em células Jurkat tratadas por 12 horas.

Ensaio realizado por citometria de fluxo após marcação com TMRE para verificar o potencial de EBH *S. jambolanum* de mobilizar as mitocôndrias no possível processo de morte celular aqui apresentado. Os dados foram obtidos através do programa Cell Quest e a análise dos dados foi realizada no programa FlowJo™ v.7.6.1, Tree Star, Inc. Análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 5, GraphPad.. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle sem tratamento. (ANOVA teste a posteriori de Tukey). Histogramas representativos adquiridos por citometria de fluxo (FACS-Calibur).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de citotoxicidade realizados pelo método de exclusão por incorporação do azul de tripano apresenta que o EBHSJ possui potencial citotóxico em linhagem de leucemia linfocítica aguda (Jurkat) de modo que reduz a viabilidade à medida que aumenta a concentração do extrato (concentração-dependente). Possivelmente esse processo citotóxico é dependente da mobilização mitocondrial, de forma que foi evidenciada a redução do potencial de membrana sutilmente.

. Referências Bibliográficas

1. Cragg, G.M., Newman, D.J., 2005. Plants as source of anticancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 72–79.

2. Li, X.K., Motwani, M., Tong, W., Bornmann, W., Schwartz, G.K., 2000. Huanglian, a chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells. *Molecular Pharmacology* 58, 1287–1293.
3. Maria Claudia Lazzê, Monica Savio, Roberto Pizzala, Ornella Cazzalini, Paola Perucca, Anna Ivana Scovassi, Lucia Anna Stivala and Livia Bianchi. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis* vol.25 no.8 pp.1427--1433, 2004
4. D. Bagchi, C. K. Sen, M. Bagchi, and M. Atalay. Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anti-carcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 69, No. 1, 2004, pp. 75-80.
5. Loguercio, A.P.; Battistin, A.; Vargas, A.C.; Henzel, A.; Witt, N.M. 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, v35, n.2, p.371-376, mar-abr ISSN 0103-8478.
6. ATCC Organization: <http://www.atcc.org/products/all/TIB-152.aspx#characteristics>. Acesso em 20/08/2015.
7. Luzia, D.M.M.; Jorge, N. 2009. Composição centesimal, potencial antioxidante e perfil dos ácidos graxos de sementes de jambolão (*Syzygium cumini* L.)¹ Analytical composition, antioxidant potential and fatty acid profile of jambolan (*Syzygium cumini* L.) *Revista Ciência Agronômica*. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE ISSN 1806-6690, v. 40, n. 2, p. 219-223, abr-jun.
8. Soumyajit Maiti, Kazi M. Ali, Kishalay Jana, Kausik Chatterjee, Debasis De, and Debidas Ghosh Ameliorating effect of mother tincture of *Syzygium jambolanum* on carbohydrate and lipid metabolic disorders in streptozotocin-induced diabetic rat: Homeopathic remedy *J Nat Sci Biol Med*. 2013 Jan-Jun; 4(1): 68–73.

9. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 2005; 106: 408-441.

10. SOARES, M., WELTE, L., KUSKOSKI, E. M., GONZAGA, L., FETT R. 2008. COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA CASCA DE UVAS NIÁGARA E ISABEL. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 059-064.

11. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat Protoc.** 2006;1(3):1458-61.

12. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ.** 2012;19(1):107-20.

13. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death Differ.** 2006;13(9):1423-33.