

4.03.01 Farmacologia/Farmacognosia

Avaliação do potencial citotóxico do extrato alcoólico de *Smilax fluminensis* em fibroblastos e melanoma murino.

Matheus Emboava Lopes^{1*}, Giovanni João Charro¹, Isabela Lyrio de Souza¹, Haliny de Mari Fernandes¹, Wilgner José de Sousa Santos¹, Camilla Alves Vidal Lima¹, Pedro Inácio Giese¹, Jéssica Melão¹, Thais Farias², Rodrigo Juliano Oliveira², Doroty Mesquita Dourado³, Rosemary Matias³, Mariana de Oliveira Mauro⁴.

1. Estudante do curso de Medicina da Universidade Anhanguera Uniderp – Campo Grande - MS.
2. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – CETROGEN/HUMAP/EBSERH- Campo Grande – MS.
3. Professora Doutora da Universidade Anhanguera Uniderp – Campo Grande - MS.
4. Professora Doutora do curso de Medicina da Universidade Anhanguera Uniderp/Orientadora – Campo Grande – MS.

Resumo

Estudos foram realizados buscando avaliar os efeitos biológicos de espécies de *Smilax* nativas do Brasil e confirmaram o efeito anti-hanseníaco, depurativo e diurético da planta. No entanto não está definido o nível de citotoxicidade celular que seu extrato poderá gerar em células de mamíferos. No presente trabalho foi avaliado o extrato alcóolico de *Smilax fluminensis* em células de fibroblasto murino (3T3) e melanoma murino (B16F10). O teste de citotoxicidade/viabilidade celular utilizado foi o MTT e realizado em triplicata por um período de 24 e 48h. Observou-se que o extrato possui uma IC50 em células de fibroblasto murino na concentração de 500ng/L após 48h de experimentação. Já em células de melanoma murino observa-se no tempo experimental de 48h uma IC50 na concentração de 250ng/L. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico de extratos alcóolicos de *Smilax fluminensis* em linhagens celulares de fibroblastgo murino (3T3) melanoma murino (B16F10).

Palavras-chave: Câncer, IC50, MTT.

Apoio financeiro: FUNDECT.

Introdução

Salsaparrilha é o nome originalmente atribuído às espécies de gênero *Smilax*, plantas nativas das Américas. O gênero *Smilax* tem aproximadamente 300 espécies, e se distribui por todo o continente Americano nas regiões temperadas, subtropicais e, principalmente, nas regiões tropicais. No Brasil, a espécie pode ser encontrada em todo o território nacional [1] e produz metabolitos secundários: compostos fenólicos, taninos, flavonoides e triterpenos, compostos com reconhecida atividade antiproliferativa. No Brasil, as principais espécies desse gênero usadas na medicina popular são: *Smilax brasiliensis* Spreng., *S. campestris* Griseb. e *S. fluminensis* Steud. [2].

Utilizando-se da premissa que esta planta possui compostos com atividade antiproliferativa, entende-se que o estudo dos mecanismos que levam a redução da proliferação ceular torna-se importante alvo farmacológico. Plantas medicinais, tem sido alvo dos cientistas ao perceberem que elas são uma fonte rica para o desenvolvimento de novos fármacos [3].

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos e tem predominância em adultos brancos [4]. Outro fato relacionado com o desenvolvimento desta neoplasia é a associação com a radiação ultravioleta, devido a repetidas alterações nos nervos, cuja etiologia relaciona-se com a exposição solar interrupta. Existem ainda outros fatores associados à gênese desta doença, como a presença de irritações crônicas e contato com substâncias químicas [5].

Diante do grande desafio terapêutico que se configura o melanoma para o setor público e privado de saúde, verifica-se a necessidade da identificação de novos alvos terapêuticos e/ou profiláticos que sejam menos agressivos, propiciando, com isso, a obtenção de melhores respostas aos tratamentos realizados e melhoria da qualidade de vida dos portadores.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade do extrato alcóolico de *Smilax fluminensis* em células não tumorais de fibroblasto murino (3T3) e células de melanoma murino (B16F10), a fim de determinar o potencial citotóxico deste extrato em células acometidas pela neoplasia e células saudáveis.

Metodologia

O extrato de *Smilax fluminensis* foi cedido pela professora Dra. Rosemary Mathias – Uniderp Anhanguera. O extrato foi testado primeiramente em células de fibroblasto murino (3T3) nas concentrações de 500, 250 e 25ng/L por períodos de 24 e 48h. Após a obtenção destes resultados definiu-se as concentrações a serem testadas em células de melanoma murino (B16F10). Desta forma, utilizou-se nessa segunda parte da experimentação as concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250ng/L em períodos de exposição de 24 e 48h.

O teste de citotoxicidade/viabilidade celular utilizado foi o método de MTT realizado em triplicata. As

células foram cultivadas em meio DEMEM por 24h para estabilização do cultivo celular, após este período foram tratadas com o extrato em diferentes concentrações por mais 24h e 48h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e foi adicionado o MTT. Após 4h, o formazan formado foi solubilizado com DMSO e a absorbância foi lida em 550 nm. A partir dos dados obtidos calculou-se a viabilidade celular por meio do cálculo a seguir:

$$\text{Viabilidade celular} = \text{Absorbância média da concentração teste} \times (100 / \text{absorbância média do controle})$$

Os resultados obtidos permitiu a identificação da IC50 (a metade da concentração inibitória máxima) em ambos os tipos celulares testados.

Resultados e Discussão

Nenhuma das concentrações testadas do extrato apresentou citotoxicidade em 24h em ambos os tipos celulares, no entanto quando avaliados em 48h observa-se uma redução da viabilidade celular. Em células 3T3 observou-se que a concentração de 500ng/L levou a uma redução da viabilidade a níveis similares ao do grupo controle positivo. Sendo a IC50 do extrato em células 3T3 de 500ng/L.

Por meio do resultado obtido, definiu-se as concentrações a serem testadas em B16F10, sendo elas abaixo dos valores de IC50 obtido no teste anterior, haja visto que células tumorais possuem uma maior instabilidade genômica e poderiam responder de forma eficaz a concentrações menores do extrato. As doses testadas foram 0,25; 2,5; 25 e 250ng/L.

Os resultados indicaram uma resposta dose dependente, ou seja, obteve-se maior citotoxicidade nas maiores concentrações testadas. De tal forma que a IC50 de *Smilax fluminensis* foi de 250ng/mL. Entende-se que por ser uma linhagem celular bastante resistente aos mecanismos de morte, a B16F10 não respondeu adequadamente aos compostos químicos presente aos extratos, desta forma infere-se que para uma atividade eficaz sobre a linhagem seria necessário concentrações mais altas do extrato, haja visto a percepção de uma dose resposta em 48h.

Tabela: Porcentagem de viabilidade celular obtida por meio do teste de MTT após 24 e 48h de tratamento com extrato alcóolico de *Smilax Fluminensis* em células 3T3 e B16 F10.

CÉLULAS 3T3 - VIABILIDADE CELULAR (%)		
Grupos experimentais	24h	48h
Controle	100	100
Controle positivo	20,15	48,49
<i>S. fluminensis</i> 25ng/L	113,43	50,28
<i>S. fluminensis</i> 250ng/L	141,02	72,58
<i>S. fluminensis</i> 500ng/L	157,67	95,21
	100	100
CÉLULAS B16F10- VIABILIDADE CELULAR (%)		
Grupos experimentais	24h	48h
Controle	100	100
Controle positivo	27,76	27,76
<i>S. fluminensis</i> 0,25ng/L	97,85	93,18
<i>S. fluminensis</i> 2,5ng/L	96,91	96,89
<i>S. fluminensis</i> 25ng/L	89,63	89,88
<i>S. fluminensis</i> 250ng/L	62,45	47,93

Conclusões

O extrato alcóolico de *Smilax fluminensis* apesar de não apresentar atividade citotóxica após 24h de exposição possui esta atividade após 48h e tem uma IC50 de 500ng/L em células 3T3 e de 250ng/mL em células B16F10. Por meio destes resultados infere-se que o extrato alcóolico de *Smilax fluminensis* possui uma atividade mais intensa em células tumorais (B16F10) do que em células não alteradas (3T3), mostrando-se pouco citotóxica em células saudáveis e maior citotoxicidade em células tumorais.

O que revela a necessidade de testar esses extratos em diferentes linhagens celulares para verificar se essa atividade seletiva se aplica em outros tipos celulares.

Referências bibliográficas

- [1] MARQUES, J.S. Hemiscola In: MACIEL, J. R.,CORNEJO, X.,MARQUES, J.S.,NETO, R.L.S.,COSTA-E-SILVA, M.B. Cleomaceae In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016
- [2] LORENZI, H; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2a edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 544 p., 2008.
- [3] PEREIRA, F.L. **Potencial das raízes de smilax brasiliensis spreng. (smilacaceae) e herreria salsaparilha mart. (agavaceae) no tratamento de alterações metabólicas, induzidas por dieta em camundongos BALB/c**. Dissertação do. Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. 2013
- [4] INCA, **Pele Melanoma**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao+>. Acesso em 10 mar. 2018.
- [5] THOMPSON, J. F.; SCAYLER, R. A.; KEFFORD, R. F. **Cutaneous Melanoma**.*Lancet*,v. 365, p. 387-701, 2005.