

## **Avaliação da ação do extrato de *Spilanthes acmella* em linhagens celulares Hep-2 e L929**

**Carlos Augusto Priante da Silva<sup>1</sup>, Valeria Rosseto Lemos<sup>2</sup>, Ary Gomes da Silva<sup>2</sup>,  
Cristina Pacheco Soares<sup>n</sup>**

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Paraíba (Univap) / Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) – Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares; Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, São José dos Campos – SP - [carlospriante@ig.com.br](mailto:carlospriante@ig.com.br)

<sup>2</sup> Centro Universitário Vila Velha, Rua Jairo Mattos Pereira, 49. Santos Dumont, Vila Velha – ES  
[vr-lemos@uol.com.br](mailto:vr-lemos@uol.com.br), [arygomes@uvv.br](mailto:arygomes@uvv.br)

<sup>n</sup> Universidade do Vale do Paraíba (Univap) / Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) – Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares; Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, São José dos Campos – SP [cpsoares@univap.br](mailto:cpsoares@univap.br)

**Resumo-** A medicina complementar alternativa vem crescendo com opção no tratamento para o câncer. Existem plantas que produzem substâncias antimitóticas capazes de deter o crescimento de tumores. Sendo assim, o presente trabalho avaliou a ação do extrato de *Spilanthes acmella* em células tumorais. A aplicação em concentrações variáveis do extrato foi utilizada para fins terapêuticos em células neoplásicas da linhagem HEP-2, com intuito de avaliar a citotoxicidade, atividade mitocondrial e citoesqueleto, através do teste de MTT e microscopia de fluorescência. O mesmo foi aplicado em células fibroblásticas de camundongo de linhagem L929 com o fim de comparar a ação do extrato em células tumorais e não-tumorais, determinando assim sua viabilidade como tratamento para o câncer. O teste de MTT apresentou uma DL de 50% a partir da solução de 0.5mg/mL para a linhagem HEP-2 e uma DL de 80% para a linhagem L929. A análise da disposição dos filamentos de actina possibilitou observar que as células incubadas com o extrato de *S.acmella* nas concentrações de 1.0 e 0.5mg/mL, apresentaram despolimerização dos filamentos de actina de ambas as linhagens, ocasionando perda da morfologia e adesão celular.

**Palavras-chave:** câncer, fitoterápico, *Spilanthes acmella*.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas.

### **Introdução**

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado das células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (BARBOSA, 2003).

Dentre os diversos tratamentos para o câncer a medicina complementar alternativa (MCA) vem ganhando destaque na sociedade, com um principal interesse nas ervas medicinais, as quais apresentam grande potencial terapêutico, porém com poucos conhecimentos sobre a ação dos mesmos sobre as células cancerígenas (RENÓ, 2010, p.13).

Existem plantas que produzem substâncias antimitóticas, capazes de deter o crescimento de tumores malignos. O uso habitual destas plantas exerce uma comprovada ação preventiva do câncer (CANTO VERDE, 2010).

*Spilanthes acmella* é uma planta herbácea pertencente à família *Asteraceae*, sendo conhecida por sua ação medicinal. *S.acmella* é comumente usada em casos de dor de dentes, gargarejo e em estomatites. Estudos anteriores demonstraram ainda sua ação como diurético, antibacteriano e antiinflamatório (WU et al. 2008). *Spilanthes* contém uma série de compostos biologicamente ativos, dos quais os mais estudados têm sido as alquilamidas que esta planta possui em abundância (BAE et al. 2010). O principal interesse em *S.acmella* só foi recentemente alimentada pelos resultados pré-clínicos de teste, que são principalmente atribuídos ao mais proeminente N-alkylamide, a N-isobutylamide spilanthol (BOONEN et al. 2010), obtidos a partir da inflorescência das folhas da planta.

Pesquisas recentes relatam ainda a atividade do extrato de *S.acmella* como antitumoral.

Devido a esta atividade, foram feitas aplicações em concentrações variáveis deste extrato para fins terapêuticos em células neoplásicas da linhagem HEP-2 (câncer de

laringe), com intuito de avaliar a citotoxicidade, atividade mitocondrial e citoesqueleto, através do teste de MTT e microscopia de fluorescência. O mesmo foi aplicado em células fibroblásticas de camundongo linhagem L929 com o fim de comparar a ação do extrato em células tumorais e não-tumorais, determinando assim sua viabilidade como tratamento para o câncer.

## Metodologia

As linhagens celulares utilizadas nos experimentos foram obtidas do Instituto Adolfo Lutz - Seção de Cultura Celulares, (São Paulo/SP).

## Preparação do extrato

As inflorescências da *Acmella ciliata* Khunt foram coletadas no horto da Escola Superior São Francisco de Assis – ESFA, localizada no município de Santa Teresa, região noroeste do estado do Espírito Santo. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Ary Gomes da Silva. Uma exsicata desta espécie foi depositada no Museu de Biologia Melo Leitão para realização de seu registro, recebendo código MBML: 22722. Após a coleta, o material foi mantido em sala de secagem por duas semanas em temperatura ambiente, em seguida, foram colocadas em estufa de secagem para retirada da umidade em temperatura de 45° a 50°C, por aproximadamente 3 horas.

Após o processo de secagem as inflorescências foram submetidas ao processo de moagem na UVV (Centro Universitário Vila Velha), sendo posteriormente mantidas em maceração com etanol 92,8°GL por 24 horas em percolador. Terminada a maceração, foi realizado o esgotamento por lixiviação em fluxo contínuo com adição de etanol até a perda visível da coloração do extrato. O extrato bruto foi concentrado em evaporador rotativo em banho-maria de 70°-75°C para a eliminação parcial do solvente.

Após a evaporação parcial do solvente, o extrato foi colocado em estufa de secagem (Fanem) a 66°C para evaporação total do solvente, por um período de 2 horas.

Após este período, o extrato bruto foi ressuspenso em metanol e colocado nas placas de cultura de células, no Laboratório de Cultura de Células da UNIVAP (Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos – SP).

O extrato foi preparado pela Prof<sup>ª</sup>. MSc Valéria Rosseto Lemos e pelo Prof. Dr. Ary Gomes da

Silva, ambos do Centro Universitário de Vila Velha-ES.

### - Marcação de filamentos de actina

As células de linhagens Hep-2 e L929 foram plaqueadas separadamente a uma densidade de  $1 \times 10^4$  por poços em placas de 96 poços e 24 poços respectivamente. Em cada poço contendo 200µl de meio MEM (com 10% de SFB e de 1% antibiótico e antimicótico). As células foram incubadas a 37°C em estufa até o dia seguinte. Foram então adicionadas sobre as culturas de células as diluições do extrato de *Spilanthus acmella* em diferentes concentrações (1 mg, 500µg, 250 µg).

As células então foram permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS por 10 minutos, bloqueadas por 30 minutos com solução BSA 1% em PBS e incubadas por 1 hora com faloidina-TRITC a 20µL em solução de BSA 1%. Para a retirada do excesso de corante as células foram lavadas três vezes com PBS, a cada adição. As amostras foram analisadas com auxílio de um microscópio de fluorescência modelo Leica DMLB acoplado ao sistema fotográfico Leica MPS-30.

### - Teste de citotoxicidade

A técnica de MTT é utilizada para avaliar a atividade mitocondrial e assim, a viabilidade celular. Para ensaio de MTT, as células de ambas as linhagens, Hep-2 e L929, foram plaqueadas separadamente a uma densidade de  $1 \times 10^4$  por poços em placas de 96 poços e 24 poços respectivamente. Em cada poço contendo 200µl de meio MEM (com 10% de SFB e de 1% antibiótico e antimicótico). As células foram incubadas até o dia seguinte para adesão a 37°C em estufa. Foram então adicionadas sobre as culturas de células HEp-2 e L929, cultivadas em triplicata, as diluições do extrato de *Spilanthus acmella* em diferentes concentrações (1mg, 500µg e 250µg), nos demais poços foram adicionados pedaços de luva descartável e filtro de papel e um semente de células. As culturas foram incubadas com as diluições por períodos de 24 horas.

Após a incubação os poços foram lavados com PBS, em seguida foi adicionado o MTT diluído em PBS na concentração de 200µl. As células foram incubadas por 60 minutos a 37°C em estufa. Posteriormente foram adicionados às placas 200 µl de DMSO por poço, em seguida as placas foram agitadas por 60 minutos para diluição dos cristais. A leitura da absorbância das placas foi feita em leitor de ELISA (Elisa Spectracount, Packard, EUA).

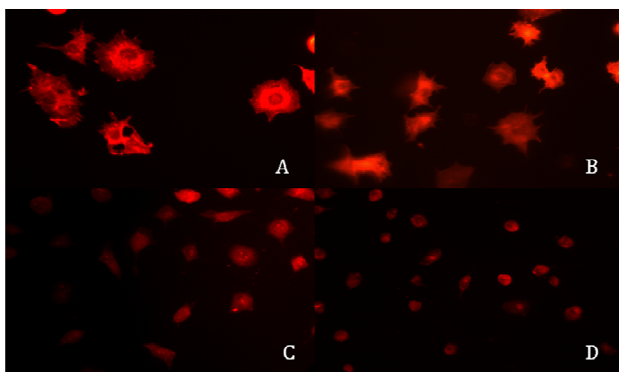
Os dados obtidos foram transformados em porcentagem de atividade mitocondrial em relação ao controle e assim, calculados pela fórmula a seguir.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{(\text{absorbância das células tratadas} - \text{absorbância do branco}) \times 100}{(\text{absorbância das células controle} - \text{absorbância do branco})}$$

## Resultados

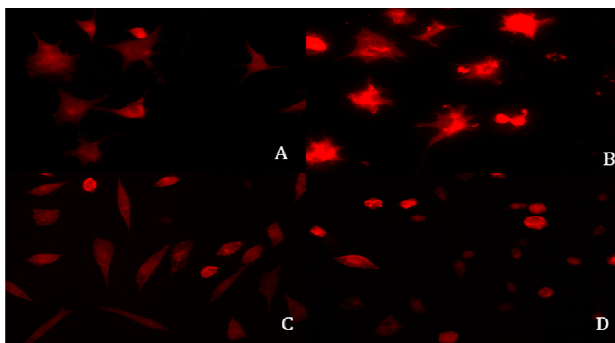
### - Marcação de filamentos de actina

A marcação dos filamentos de actina em células de linhagem HEP-2 revelou uma gradativa queda dos filamentos, sobretudo em células incubadas com a concentração de 1 mg/ml de extrato de *S.acmella* (Fig.1), resultando em uma retração do citoesqueleto e assim, uma alteração na morfologia de célula.



**Figura 1:** **A:** Grupo controle (somente células). Observa-se uma disposição uniforme dos filamentos. **B:** Células incubadas com 250µg/ml de extrato. Observa-se uma disposição uniforme, porém intensa dos filamentos. **C:** Células incubadas com 500µg/ml de extrato. Observa-se uma disposição com leve retração dos filamentos. **D:** Células incubadas com 1mg/ml de extrato. Observa-se uma disposição filamentos, com forte retração do citoesqueleto e alteração na morfologia celular.

A marcação dos filamentos de actina em células de linhagem L929 revelou uma gradativa queda dos filamentos, principalmente em células incubadas com as concentrações de 1mg/ml (Fig.8) e 500µl/ml (Fig.2) de extrato de *S.acmella*, resultando em uma retração do citoesqueleto e assim, uma alteração na morfologia da célula.

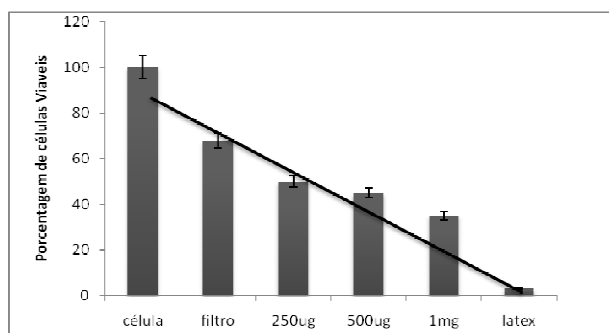


**Figura 2:** **A:** Grupo controle (somente células). Observa-se uma disposição uniforme dos filamentos. **B:** Células incubadas com 250µg/ml de extrato. Observa-se uma disposição uniforme, porém intensa dos filamentos. **C:** Células incubadas com 500µg/ml de. Observa-se uma intensa retração do citoesqueleto e alteração na morfologia da célula. **D:** Células incubadas com 1mg/ml de extrato. Observa-se uma significativa alteração na morfologia das células, além de morte celular.

### - Teste de citotoxicidade

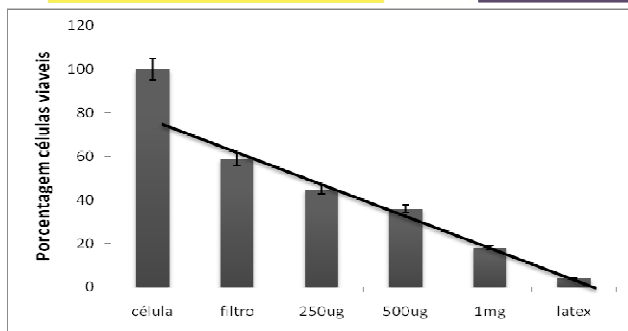
O teste de citotoxicidade (MTT) avalia a atividade mitocondrial baseada na análise de produtos mitocondriais encontrados somente em células metabolicamente ativas.

Os dados obtidos a partir do teste de MTT de células neoplásicas HEP-2 revelou uma significativa redução de população de células para concentrações de 1mg/ml e 500µg/ml (Fig.3) incubadas com extrato de *S.acmella*. Esta redução representa aproximadamente 50%.



**Figura 3 :** Porcentagem de células viáveis obtidas pelo teste de MTT de linhagem HEP-2.

Os dados obtidos a partir do teste de MTT de células fibroblásticas de camundongo L929 revelaram uma importante redução de população de células para todas as concentrações testadas (1mg/ml, 500µg/ml e 250µg/ml (Fig.4) incubadas com extrato de *S.acmella*. Esta redução representa aproximadamente 50% para concentração de 250 µg/ml. Nas demais concentrações de 1mg/ml e 500µg/ml a redução chegou a aproximadamente 80% e 60% respectivamente.



**Figura 4** : Porcentagem de células viáveis obtidas pelo teste de MTT de linhagem L929.

## Discussão

O emprego de plantas no tratamento de doenças começou de maneira empírica, muitas vezes atendendo à forma das folhas, dos frutos, etc. por configurarem partes do corpo humano doentes, mas pouco a pouco, a experimentação foi selecionando as plantas de maior interesse. O resultado desse uso passa assim, inicialmente, de uma geração a outra pela transmissão oral e, depois também, por descrições em livros deixados por todas as civilizações que nos precederam. É esta a primeira fitoterapia que o homem usou. (CUNHA et al., 2003).

A fitoterapia se inclui na medicina complementar alternativa (MCA) que se baseia no uso de plantas medicinais no tratamento e cura de doenças, como o câncer. Depois que a malignidade é diagnosticada e estabelecida, escolhas de MCA servem para potencializar a quimioterapia, contribuir para a supressão do tumor, impedir metástase e estabelecer a remissão (MAZZIO et al. 2008).

Assim cresce na atualidade o interesse no uso de plantas medicinais para cura e tratamento de doenças, sobretudo o câncer.

As plantas medicinais são utilizadas mundialmente para o tratamento de doenças, e a maioria delas não foram suficientemente estudadas, no que se refere ao seu potencial citotóxico/mutagênico (BAGATINE, 2007).

As marcações testadas mostram um forte potencial de ação do extrato de *S. acmella* em células tumorais de linhagem HEp-2 (carcinoma de laringe) quando submetidas a concentrações de 1mg/ml e 500µg/ml.

Os mesmos resultados foram observados em linhagem celular de L929 (fibroblasto de camundongo).

A atividade do extrato de *S. acmella* sob o citoesqueleto das linhagens testadas revela uma alta ação do extrato sob células não-tumorais, resultando

em um alto nível de perda de adesão e alteração na morfologia das células.

## Conclusão

A redução do número de populações celulares observadas a partir do teste de MTT, reduzida até 80% para linhagem de células não-tumorais L929, indica que o uso do extrato de *S. acmella* como terapêutico no tratamento do câncer é inviável, já que este acarreta danos em células tumorais e não-tumorais.

A ação do extrato de *S. acmella* sob o citoesqueleto das linhagens citadas é caracterizada pela redução dos filamentos de actina, resultando em uma alteração na morfologia celular e perda de adesão.

Contudo, mais estudos são necessários para um maior entendimento da ação do extrato de *S. acmella*, pois diversos fatores como temperatura, local de plantio, colheita da erva e preparação do extrato, podem alterar ou até inativar os compostos ativos encontrados em plantas medicinais.

## Referências

- BAE, S. S., EHRMANN, B. M., ETTEFAGH, K. A., CECH, N. B., A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr, 2010.
- BAGATINE, M. D., SILVA, A. C. F., TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais, 2007.
- BARBOSA, A.M. Câncer direito e cidadania - São Paulo, 2003, 8ª edição.
- BOONEN, J., BAERT, B., BURVENICH, C., BLONDEEL, P., DE SAEGER, S., DE SPIEGELEER, B., LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol, 2010.

- CANTO VERDE- Câncer e as plantas medicinais.

Disponível em:

[www.cantoverde.org/cancer/cancer\\_e\\_plantasmedicinas.html](http://www.cantoverde.org/cancer/cancer_e_plantasmedicinas.html). Acesso em: 16 julho de 2011.

- CUNHA, A. P. SILVA, A. P. ROQUE, O. R. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

- MAZZIO, E. A., SOLIMAN, K. F. A., In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs, 2008.

- RENÓ, F. G. F.; LEMOS, V. R.; SILVA, A. G.; CAMPOY, R. M., SILVA, C. A. P., PACHECO-SOARES, C.; Avaliação da atividade antitumoral de extrato *Spilanthes acmella*. 2010. XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos - SP.

- WU, L., FAN, N., LIN, M., CHU, L., HUANG, S., HU, C., HAN, S., Anti-inflammatory effect so spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulation LPS-induced inflammatory mediators, 2008.