

ACÇÃO ANTITUMORAL DO LÁTEX DE *Euphorbia tirucalli* (AVELÓS) E *Synadenium grantii* Hook (JANAÚBA) EM CÉLULAS MCF-7

Raíssa da Costa Furtado¹, Mariela Inês Batista Santos¹, Geisa Rodrigues Salles¹, Walderez Moreira Joaquim¹, Antonieta Marques Caldeira Zabeu², Cristina Pacheco-Soares¹.

¹Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000- São José dos Campos - SP, Brasil, raissacfurtado@gmail.com; mariela_batista@icloud.com; geisa_salles@yahoo.com.br walcrasunivap@gmail.com; cpsoares@univap.br.

²Vetlaser Fototerapia e Reabilitação, São José dos Campos - SP, Brasil, antonietazabeu@gmail.com.

Resumo

Neoplasias possuem alta incidência em cães e gatos, principalmente as mamárias em fêmeas, possuindo altas taxas de morbidade e mortalidade. Os tratamentos hoje disponíveis, podem não ser totalmente satisfatórios e possuem efeitos colaterais. A busca por novas alternativas terapêuticas, torna-se relevante, na intenção de reduzir efeitos adversos e obter resultados significativos. As plantas da família Euphorbiaceae são utilizadas pela medicina popular, sendo a *Euphorbia tirucalli* (Avelós) e a *Synadenium grantii* Hook (Janaúba), as espécies empregadas para o tratamento de pacientes oncológicos. O objetivo do projeto, foi avaliar os efeitos antitumorais destas plantas, utilizando modelo celular *in vitro* de MCF-7. O látex foi obtido das plantas cultivadas no viveiro localizado na Universidade do Vale do Paraíba, divididas nas exposições solares de 30% e 100%. Realizou-se ensaio de viabilidade celular nas células incubadas com os látex por 24 e 48 horas e marcação para filamentos de actina e núcleo dos grupos. Os resultados indicaram significativa morte celular e alteração estrutural do citoesqueleto e núcleo das células após os tratamentos realizados.

Palavras-chave: Câncer. Látex. Euphorbiaceae. Tratamento. Medicina Integrativa.

Área do Conhecimento: Medicina Veterinária.

Introdução

O câncer surge a partir de seis ou mais mutações e/ou alterações genéticas, aliadas há diversos fatores que ocorrem no organismo, podendo ser hereditários (epigenética) ou extrínsecos (radiação, poluição, vírus, substâncias químicas, etc.), que irão interferir nos mecanismos de proliferação celular (ONUICHIC; CHAMMAS, 2010), pois células saudáveis, por meio de sinais bioquímicos, se desenvolvem, diferenciam-se e morrem, enquanto células cancerígenas não respondem a estes sinais e se proliferam de maneira inadequada e exacerbada no organismo (dando origem ao tumor), invalidando o processo natural (ALVES; NEPOMUCENO, 2012).

Nos animais, as células neoplásicas assumem diferentes formas e níveis de agressividade, sendo o câncer considerado a doença de maior mortalidade, responsável por cerca de 50% dos óbitos ocorridos, situação de grande sofrimento para tutores e equipe profissional veterinária (FUKUMASU *et al.*, 2015; DE MENINE, 2021). A incidência vem aumentando, tornando-se difícil prever a expectativa de vida de cães e gatos acometidos, pois as neoplasias mais comuns nestes pacientes são malignas em sua maioria, possuindo diversos fatores de risco, principalmente quando o diagnóstico é tardio, impossibilitando tratamento de sucesso (REYS *et al.*, 2020). É importante ressaltar que a prevenção, o acesso precoce ao diagnóstico e tratamento de neoplasias favorecem as chances de cura, tornando a terapia em pacientes oncológicos mais promissora (STRASSER-WEIPPL *et al.*, 2015). De acordo com Magrin (2020), cerca de 70% das neoplasias como as de mama, por exemplo, são malignas e afetam principalmente fêmeas com idades entre 7 e 12 anos, onde o tratamento geralmente é cirúrgico, podendo envolver quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia, visando o controle local e sistêmico da doença.

Muitos são os estudos que analisam a toxicidade e os índices de respostas a essas condutas e é notável a necessidade de mais pesquisas que estudem novas alternativas terapêuticas com menor toxicidade e efeitos colaterais. Sendo assim, a busca por novas substâncias com atividade antitumoral é de extrema importância, uma vez que diversos tipos de tumores desenvolvem resistência às drogas existentes (DE CARVALHO; DE ALMEIDA, 2020). As plantas *E. tirucalli* e *S. grantii* Hook são arbustos de grande porte, nativas da África. No Brasil, o látex de ambas é preparado na forma de “garrafada”, sendo utilizado pela medicina popular (ANDRADE *et al.*, 2020). Estas plantas têm demonstrado algumas propriedades farmacológicas anticarcinogênicas, antiinflamatórias, atividade hemostática, ação fibrinolítica e imunorreguladoras. Portanto, torna-se necessário que estudos levem à descoberta de seus mecanismos de ação terapêutica, porém, pesquisas direcionadas e complexas, desde a experimentação *in vitro* até o estudo *in vivo*, precisam ser conduzidas (MARTINS *et al.*, 2017). Este projeto propôs estudar, em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), viabilidade celular e distribuição dos filamentos de actina, após a exposição ao tratamento com o látex de cada uma das plantas previamente cultivadas sob exposição total ou parcial (30%) à luz solar.

Metodologia

1. Plantio e cultivo de Avelós e Janaúba

Quatro mudas de *E. tirucalli* (Avelós) e duas mudas de *S. grantii* Hook (Janaúba) foram plantadas e cultivadas no viveiro de plantas localizado na UNIVAP, utilizando substrato para plantas classe A BIOMIX puro, contendo composto orgânico, cinzas e cascas de eucalipto, condutividade elétrica 0,8 mS/cm, CRA de 55%, umidade de 45%, densidade de 350 kg/m³ e pH 6,8.

2. Crescimento das plantas sob diferentes exposições solares

Um vaso de cada espécie foi posicionado a 100% de exposição à luz solar e, os demais, sob uma tenda de proteção, permitindo 30% de incidência solar. Desta forma, pode-se avaliar se a exposição solar tem efeito diferencial sobre a possível ação anticarcinogênica.

3. Coleta do látex das plantas

A partir da extração de folhas da Janaúba e galhos da Avelós, o material leitoso foi coletado. Duas gotas (aproximadamente 45 µL) do látex de cada espécie foram coletadas e diluídas em 4955 µL de água ultrapura. As amostras foram estocadas ao abrigo da luz (envoltas com papel alumínio), a 4 °C.

4. Cultura de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7)

As células MCF-7 (BCRJ 0162) foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 25 cm², em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina 100 µg/ml e ampicilina 50 µg/ml.

5. Exposição das células ao látex

As células foram distribuídas em placas de 96 poços, na densidade de 5x10⁴ células por poço. Após plaqueamento, as células foram incubadas *overnight* em estufa, a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, realizou-se a diluição e filtração de 2,5 mL de látex e 2,5 mL de meioDMEM. Foram avaliados 5 grupos, em quadruplicata, nos períodos de 24 e 48 horas:

- a. Controle (células sem exposição ao látex);
- b. Avelós 30% (células incubadas com látex de Avelós sob 30% de exposição à luz solar);
- c. Avelós 100% (células incubadas com látex de Avelós sob 100% de exposição à luz solar);
- d. Janaúba 30% (células incubadas com látex de Janaúba sob 30% de exposição à luz solar);
- e. Janaúba 100% (células incubadas com látex de Janaúba sob 100% de exposição à luz solar).

6. Viabilidade celular

Logo após 24 ou 48 horas de exposição aos látex mencionados, as células foram incubadas à 37°C e 5% CO₂ em Resazurina 10% diluída em meio DMEM, por 2 horas, seguindo o protocolo do fabricante (ThermoFisher), o qual recomenda incubação de 1 à 4 horas com a solução e o exemplo da pesquisa de Li *et al.* (2012), que utilizou mesma linhagem celular. A Resazurina é um composto não tóxico e permeável às células, que ao entrar nelas, reduz-se em aresorufina. Células viáveis, convertem continuamente a resazurina em resorufina, aumentando a fluorescência geral e a cor do meio que envolve as células e de acordo com os estudos de Xiao *et al.* (2010) Larsson *et al.* (2020), pode-se considerar tal ensaio como de viabilidade.

Em seguida, realizou-se a leitura da fluorescência da solução no leitor de placa Vantar Star PM BMG labtech (excitação em 544 nm e emissão em 640 nm). Como controle negativo, a solução de Resazurina 10% livre de células foi incubada pelo mesmo período, nas mesmas condições.

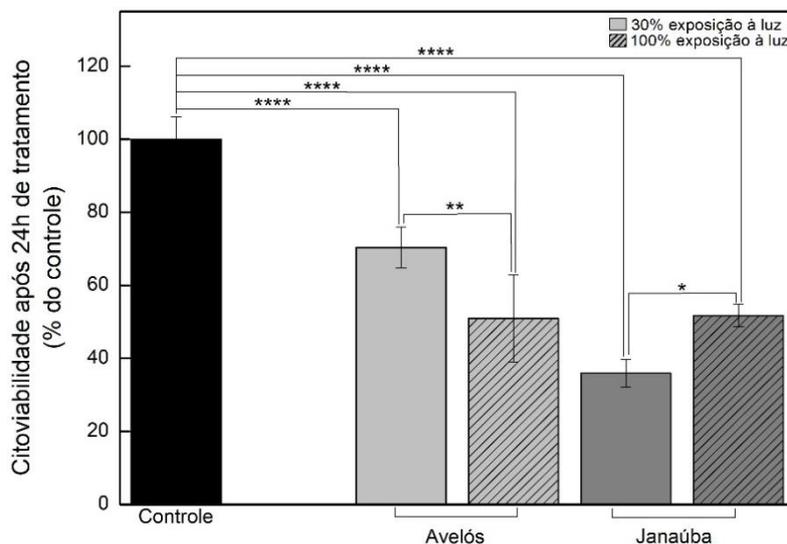
7. Marcação citoesqueleto e núcleo

A fim de observar a disposição do citoesqueleto e o aspecto da cromatina celular, logo após 48 horas de exposição aos látex, as células foram permeabilizadas, por 15 minutos, com Triton X-100 0,1% (diluído em tampão fosfato salina, PBS) e incubadas com rodamina-faloidina (1:100, Invitrogen TM, 1810954) e 0,5 µg/mL de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e analisadas no microscópio de fluorescência (Leica DMIL LED). Futuramente, com o desenvolvimento deste ensaio, serão feitas marcações celulares em diferentes tempos.

Resultados

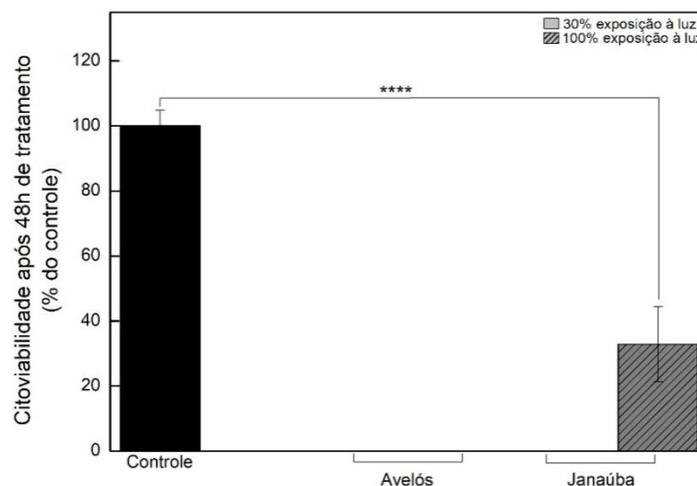
Observou-se significativa morte celular e alteração da distribuição citoplasmática nas células tratadas com os látex em diferentes condições, demonstrando importante potencial antitumoral do látex extraído de tais plantas. Pelo ensaio de citoviabilidade (**Figuras 1 e 2**), demonstrou-se a significativa eficácia dos látex na redução da viabilidade das células tumorais. Após 24 horas de exposição (**Figura 1**), todos os tratamentos reduziram significativamente ($p < 0,0001$ em relação ao grupo controle) a viabilidade celular. Já após 48 horas de incubação, as células incubadas com os látex de Avelós ou Janaúba 30% de exposição solar, tiveram sua viabilidade totalmente reduzida, ao passo que o grupo Janaúba 100% de exposição solar manteve uma pequena viabilidade ($32,9 \pm 11,6\%$, em relação ao grupo controle), a qual também foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$).

Figura 1: Citoviabilidade de células MCF-7 expostas ao látex de Avelós ou Janaúba por 24 horas. Os grupos estão distribuídos como porcentagem em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$, entre os grupos comparados).



Fonte: o autor.

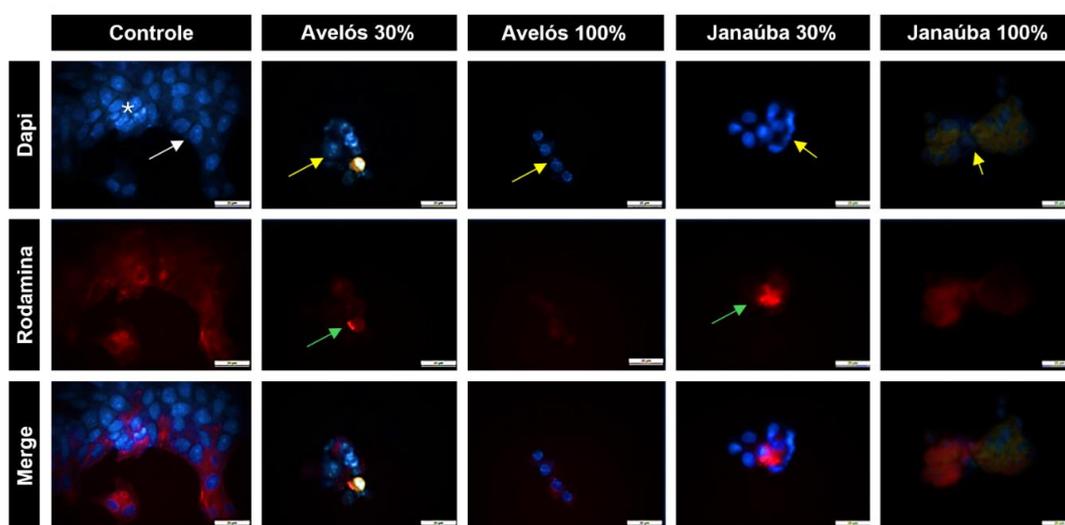
Figura 2: Citoviabilidade de células MCF-7 expostas ao látex de Avelós ou Janaúba por 48 horas. Os grupos estão distribuídos como porcentagem em relação ao grupo controle. (****p < 0,0001, em comparação ao grupo controle).



Fonte: o autor.

A marcação dos filamentos de actina, por rodaminafaloidina (**Figura 3**) foi realizada nas células MCF-7 incubadas com *E. tirucalli* e *S. grantii*. Na **Figura 3**, a primeira coluna apresenta o grupo controle, nele, a seta branca indica núcleo íntegro com cromatina marcada; o asterisco demonstra célula em processo mitótico, apontando um importante sinal de citoviabilidade neste grupo. As demais colunas demonstram os grupos tratados com Avelós ou Janaúba (30% ou 100% de exposição solar), respectivamente; neles, as setas amarelas indicam núcleo retraído, picnótico e fragmentado. As setas verdes demonstram a alteração do citoesqueleto com despolimerização dos filamentos de actina e também sua degradação, após os tratamentos antitumorais.

Figura 2: Morfologia e distribuição citoesqueleto/núcleo de células MCF-7 tratadas por 48 horas com Avelós ou Janaúba (30 ou 100% de exposição solar). As células foram marcadas com dapi (azul) e rodamina-faloidina (vermelho). A seta branca indica núcleo íntegro; o asterisco, processo mitótico. As setas amarelas apontam núcleo retraído, picnótico e fragmentado. As setas verdes demonstram retração dos filamentos de actina. Barras de escala: 20 µm.



Fonte: o autor.

Discussão

A utilização de tratamentos complementares contra o câncer, à base de fitoterápico, é de grande valia para a medicina veterinária, integrando tratamentos convencionais, proporcionando resultados significativos para o prognóstico de pacientes oncológicos. De acordo com Santos *et al.* (2016), camungos com células tumorais de Ehrlich implantadas, obtiveram ótimos resultados com o tratamento realizado com o extrato hidroalcoólico de *E. tirucalli*, aumentando a expectativa de vida dos animais. Oliveira *et al.* (2013), realizaram um estudo *in vitro* com a ação do látex da *S. Grantii Hook* em células de melanoma (B16F10) e observaram redução de sua viabilidade, corroborando com os resultados observados nas **Figuras 1 e 2**, nos quais a viabilidade de células MCF-7 foram significativamente reduzidas após 24 e 48 horas de incubação com os látex, indicando que o efeito antitumoral das plantas descritas, pode ser demonstrado em outros tipos de neoplasias, não apenas a de mama, podendo tornar a pesquisa mais ampla no futuro.

Alves & Nepomuceno (2012) descrevem que a ingestão da solução do látex de *E. tirucalli* reduz, em *Drosophila melanogaster*, a concentração de células neoplásicas, estimulando a produção de citocinas, ativando o sistema imune, comparando a ação entre o látex e um quimioterápico farmacêutico. Em concordância com Ribeiro *et al.* (2019), a Avelós possui baixa toxicidade, favorecendo este estudo para futuros ensaios *in vivo*. Já a *S. Grantii Hook* possui um raro éster diterpênico de forbol (3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato), que exibe efeito citostático favorável contra células tumorais como glioma, mama, rins e pulmão, baixa toxicidade, sendo popularmente utilizada pela medicina popular nos tratamentos para câncer, gastrite, alergias e inflamações (CAMPOS *et al.*, 2016; JESUÍNO *et al.*, 2019), o que também pode favorecer os animais que estiverem em tratamento. Conforme observado na **Figura 3**, possivelmente este efeito citostático pode ser o responsável pelo desarranjo citoesquelético observado nas células após incubação com os látex, por 48 horas.

Nossos resultados corroboram os autores acima mencionados, uma vez que foi observado potencial estatístico de redução de viabilidade (**Figuras 1 e 2**), além de desarranjo e desorganização morfológicos nucleares e citoesqueléticos das células MCF-7 (**Figura 3**) após os tratamentos realizados. Embora tais resultados sejam muito promissores, mais investigações são necessárias, a fim de contribuir com o uso destes compostos sustentáveis e naturais no combate antitumoral, incluindo análises moleculares e ensaios *in vivo* com modelos de desenvolvimento tumoral. A ciência é primordial para a descoberta de tratamentos com menos efeitos colaterais para o câncer, doença que vem degenerando a vida de diversos animais, mesmo frente as terapias convencionais. Visando a grande diversidade de plantas que o Brasil oferece, o estudo de novas técnicas terapêuticas contra o câncer, principalmente com o uso de fitofármacos, integrando o tratamento ou agindo diretamente sobre o paciente, representa um grande impacto para a sociedade e para a medicina veterinária.

Conclusão

Foi possível analisar a redução da viabilidade celular de MCF-7 frente ao tratamento com *E. Tirucalli* ou *S. Grantii Hook*, concluindo que ambas as plantas contribuem para a morte das células neoplásicas utilizadas neste ensaio. Foram também demonstradas as alterações morfológicas no núcleo e citoesqueleto das células após os tratamentos, demonstrando o potencial dos látex na desorganização estrutural das células, resultando em sua morte. Mais estudos são necessários para avaliação da citotoxicidade em células saudáveis e caracterização do látex, bem como novos ensaios em células cancerígenas, para então a utilização *in vivo* ser realizada com segurança.

Referências

ALVES, Elcio Moreira; NEPOMUCENO, Júlio César. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquire**, v. 2, n. 9, p. 125-140, 2012.

ANDRADE, Evelyn Assis de et al. Efeito citotóxico do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (*Euphorbiaceae*) para modelo de melanoma murino. 2020.

CAMPOS, Adriana et al. Antiproliferative effect of *Synadenium grantii* Hook f. stems (Euphorbiaceae) and a rare phorbol diterpene ester. **International journal of toxicology**, v. 35, n. 6, p. 666-671, 2016.

DE CARVALHO, Yasmin Bianca Guimarães; DE ALMEIDA, Jaci. Prevalência de neoplasias mamárias em cadelas associadas ao uso de contraceptivos hormonais no centro de controle de zoonoses em Resende/RJ no ano de 2019. **Revista Científica do UBM**, p. 1-22, 2020.

DE MENINE, Niciérgi Pereira Medeiros. Paliativismo em pacientes oncológicos e o impacto da eutanásia na medicina veterinária: Revisão. **Pubvet**, v. 15, p. 169, 2021.

FUKUMASU, Heidge et al. Projeto CÃO CER: uma Abordagem Educativa para a Prevenção de Cânceres em Animais. **Revista de Cultura e Extensão USP**, v. 13, p. 49-57, 2015.

JESUÍNO, Flávia Werner da Rocha et al. Effect of *Synadenium grantii* and its isolated compound on dysmenorrhea behavior model in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, p. 613-620, 2019.

LARSSON, Peter et al. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 5798, 2020.

LI, Jie et al. Hydroxyethyl disulfide as an efficient metabolic assay for cell viability in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 4, p. 603-612, 2012.

MAGRIN, Milena Giovana. Uso da tintura do Látex da Janaúba (*Synadenium grantii*) em cadelas com neoplasia mamária. 2020.

MARTINS, Maria Marta et al. *Synadenium grantii* e o câncer de mama/*Synadenium grantii* and Breast cancer. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, p. 98-101, 2017.

OLIVEIRA, Thais Latansio de et al. ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DO LÁTEX DE *Synadenium grantii* Hook. f.(Euphorbiaceae). 2013.

ONUCHIC, Ana Cláudia; CHAMMAS, Roger. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de medicina**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

REYS, M. P. et al. Conhecimento dos tutores sobre o câncer em animais e fatores epidemiológicos relacionados às neoplasias em cães e gatos atendidos no hospital veterinário da Universidade Vila Velha. **Ars Veterinaria**, v. 36, n. 4, p. 344-353, 2020.

RIBEIRO, Eliane Aparecida et al. Aveloz-Euphorbiatirucalli: Toxicidade da planta. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 17-17, 2019.

SANTOS, Orlando José dos et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Euphorbia tirucalli* na inibição do tumor ascítico de ehrlich. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, p. 18-21, 2016.

STRASSER-WEIPPL, Kathrin et al. Progress and remaining challenges for cancer control in Latin America and the Caribbean. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 14, p. 1405-1438, 2015.

XIAO, Jing et al. Monitoring of cell viability and proliferation in hydrogel-encapsulated system by resazurin assay. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, p. 1996-2007, 2010.

Agradecimentos

Agradeço ao Grande Espírito, pela força e resiliência. À todos que contribuíram para a realização desta pesquisa, à Prof^a Dr^a Antonieta Zabeu e Prof^a Dr^a Cristina Pacheco, pela paciência e valiosos conselhos, à meus familiares e amigos pelo suporte emocional e à UNIVAP pelo acolhimento.