



ATIVIDADES ANTITUMORAL DE ÁCIDOS GRAXOS NO CÂNCER COLORRETAL HUMANO, *IN VITRO*

ARLINDO SÉRGIO CUNHA JÚNIOR; PATRÍCIA MOREIRA VALENTE; ANÉSIA APARECIDA DOS SANTOS

RESUMO

O câncer é um importante problema de saúde pública porque os tratamentos disponibilizados gratuitamente a população possuem baixa seletividade, como por exemplo o quimioterápico Dacarbazina. Buscando por alternativas com maior seletividade, nosso grupo avaliou o potencial anticâncer de extratos de sementes de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*. Resultados preliminares sugerem que ácidos graxos, compostos majoritários desses extratos, podem ser responsáveis pelo elevado efeito citotóxico e seletivo observado em uma linhagem de câncer colorretal humano. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial antitumoral dos ácidos graxos oleico e palmítico *in vitro*. Para isso, as linhagens SW481 (câncer colorretal humano) e Vero (células de epitélio de rim normal de macaco verde africano) foram cultivadas em meio de cultivo RPMI1640 (10% SFB e 1% antibióticos) em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade atmosférica. A atividade citotóxica foi avaliada em células de câncer colorretal humano (SW480) e células de epitélio de rim normal de macaco verde africano (Vero), através de ensaio de MTT. Foram calculados, a partir da regressão não linear, os valores de IC₅₀, e com eles, o índice de seletividade (IS) dos ácidos. Nossos resultados demonstraram que ambos os tratamentos levaram à morte celular das linhagens. Para SW480, os valores de IC₅₀ foram 255,0 µg/mL para o ácido oleico e 80,41 µg/mL para o ácido palmítico, enquanto para Vero, obtivemos IC₅₀ de 126,5 µg/mL e 30,37 µg/mL para ácido oleico e palmítico, respectivamente. A partir dos dados de IC₅₀, o índice de seletividade entre as linhagens foi 0,496 para ácido oleico e 0,377 para ácido palmítico, demonstrando que este composto pode ser considerado um candidato a fármaco para a clínica médica.

Palavras-chave: Citotoxicidade, Câncer, Cultura de células, MTT.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças nos quais em comum, há um crescimento descontrolado de células que podem ocorrer *in situ* ou se espalhar para outros órgãos, no caso da metástase (NIH, 2021). É considerado um grande problema de saúde pública, sendo uma das quatro maiores causas de morte em indivíduos com menos de 70 anos de idade. Estima-se a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer a cada ano no Brasil durante o triênio 2020-2022. (INCA, 2020).

A Dacarbazina é o quimioterápico mais usado no tratamento de melanoma pelo Sistema Único de Saúde, em função do seu baixo custo, embora possua baixa seletividade (SI=1,0) e com isso tenha baixa capacidade de diferenciar as células tumorais das células normais. Este

medicamento se liga ao DNA, o que impede que a dupla-fita se separe, levando a interrupção da síntese proteica (Baeta *et al.*, 2019). Cisplatina e Doxorubicina são outros compostos comumente utilizados na quimioterapia que atuam ao interagir com o DNA, também possuem baixa seletividade com significativos efeitos colaterais nos indivíduos nos quais são administrados (Nascimento *et al.*, 2018). Com isso, torna-se fundamental que novos compostos sejam testados a fim de se encontrar tratamentos quimioterápicos mais seletivos. Diferentes extratos de *Passiflora* apresentaram efeitos citotóxicos, ao interromper o ciclo celular de células tumorais na fase G2/M e ao levar as células à apoptose (Amaral *et al.*, 2019). Extratos de sementes de *Passiflora molissima* apresentaram alta seletividade para as células tumorais, causando a inibição de sua proliferação sem afetar as células normais (Ballesteros-Vivas *et al.*, 2020).

Experimentos anteriormente realizados no LAPAC (Laboratório de Cultura Celular DPF/UFV, avaliaram o potencial antitumoral de extratos de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* coletadas no Cerrado mineiro, assim como sua composição química majoritária. Ambos os extratos apresentaram índice de seletividade maiores que os fármacos comerciais em uso para melanoma e câncer colorretal. Além disto, estes extratos apresentaram alto teor dos ácidos graxos, oleico e palmítico; que podem ter contribuído para a citotoxicidade dos extratos, sendo assim, é de grande interesse avaliar os efeitos citotóxicos dos ácidos graxos individualmente.

As sementes de *Passiflora edulis* demonstraram ter teores lipídicos variando entre 18,5% e 29,4%, compostos principalmente por ácido linoleico (55-66%), ácido oleico (18-20%) e ácido palmítico (10-14%) (Regis *et al.* 2015). Desta forma, este trabalho avaliou os efeitos anti-proliferativos e citotóxicos dos ácidos graxos presentes em extratos de *Passiflora* em linhagem tumoral de câncer colorretal humano (SW480) e em uma linhagem normal de primata (Vero), utilizando ensaios de MTT, a fim de avaliar a possibilidade de que esses possam vir a ser candidatos a futuros fármacos para tratamentos quimioterápicos.

2 MATERIAS E METODOS

Foram cultivadas as linhagens de câncer colorretal humano (SW480) e células de epitélio de rim normal de macaco verde africano (Vero) em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium) e meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina, estreptomicina) (meio completo - MC), em estufa a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade atmosférica até a subconfluência. Posteriormente, as linhagens foram lavadas com PBS (solução fosfato salino), tripsinizadas (Sigma-Aldrich®) e ressuspensas em meio completo para contagem em câmara de Neubauer. Foram semeadas 1 x 10⁴ células suspensas em 100 µL de MC, em cada poço das placas de 96 poços. Essas foram novamente incubadas em estufa, por 24h, para aderência.

Os ácidos graxos, adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich®), ácido palmítico (saturado) e ácido oleico (monoinsaturado) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO 0,5% - (Sigma-Aldrich®)), incorporados em MC e, cada poço com células recebeu alíquotas de 100 µL da solução nas concentrações de 528,8; 264,4; 132,2; 66,1; 33,05 e 16,5 µg/mL de ácido oleico e 175; 87,5; 43,75; 21,87; 10,93 e 5,46 µg/mL de ácido palmítico. O tempo de incubação dos tratamentos foi de 48h, posteriormente, esses foram substituídos por 50 µL de solução de meio contendo 10 % de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio) (0.5 mg / mL - Sigma-Aldrich®) e as placas foram incubadas por 3 horas, protegidas da luz. O

MTT é um sal solúvel em água que quando metabolizado pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase gera os sais de formazan. Dado esse período, foi feita a substituição do meio com MTT por DMSO a fim de causar a dissolução dos cristais. A absorbância foi medida utilizando espectrofotômetro (SpectraMax®) a 570 nm. Poços com células tratadas com meio completo contendo DMSO 0,5% foram utilizadas como controle negativo e poços sem células como branco durante a leitura da absorbância. A % de mortas representou a citotoxicidade e foi calculada utilizando os dados de absorbância (Abs) conforme a equação:

$$\frac{100 - \text{Média Abs do tratamento}}{\text{Média Abs do controle negativo}} \times 100 = \% \text{ células mortas}$$

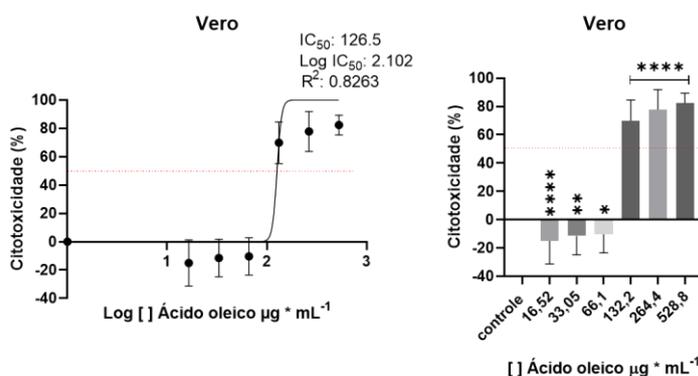
A concentração inibitória de 50% das células (IC₅₀) foi calculada para cada ácido graxo e o índice de seletividade (SI) foi calculado utilizando os resultados encontrados de IC₅₀ em células cancerosas e células normais, conforme:

$$\text{Índice de seletividade} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ linhagem normal}}{\text{IC}_{50} \text{ linhagem}}$$

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ordinary one-way. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett a 5% de significância utilizando o programa GraphPad Prism®. O IC₅₀ foi calculado por meio de uma regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células mortas), utilizando o programa GraphPad Prism® 5.0. Nos gráficos foram representados as médias de 3 experimentos independentes com seus respectivos desvios padrões.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de IC₅₀ para Vero foram 126,5 µg/mL (R²: 0,82) para o ácido oleico e 30,37 µg/mL (R²: 0,80) para o ácido palmítico. Já os valores de IC₅₀ para SW480 foram 255,0 µg/mL (R²: 0,85) para o ácido oleico e 80,41 µg/mL (R²: 0,86) para o ácido palmítico.



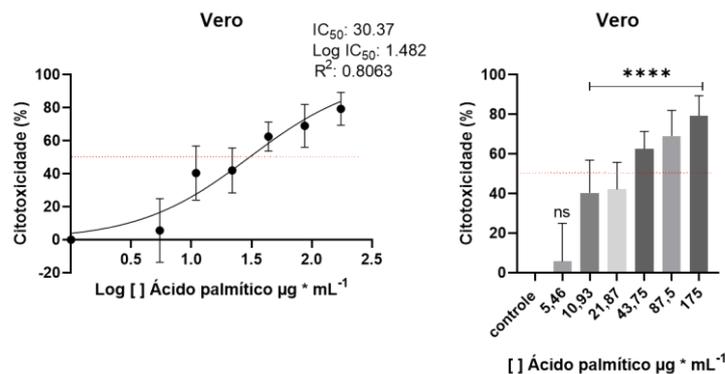
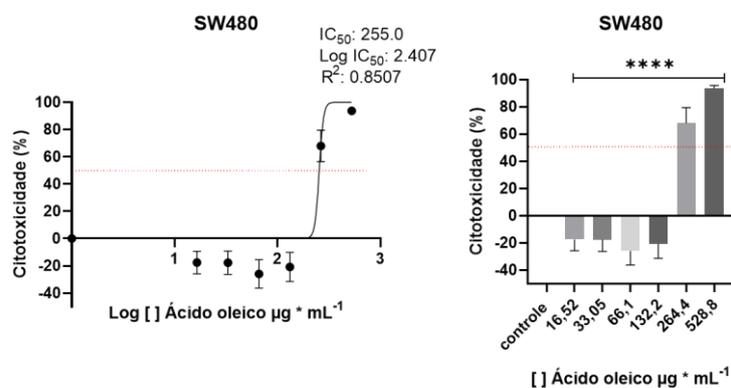


Figura 1 - Citotoxicidade de ácido oleico (gráficos superiores) e de ácido palmítico (gráficos inferiores) nas células Vero após 48h de tratamento. À direita: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada com as porcentagens de células mortas; à esquerda: média \pm dos desvios padrões de três experimentos independentes para cada tratamento, submetidos ao teste de Dunnett (5% de significância).

Assim, os valores de IC_{50} de Vero foram inferiores aos de SW480, o que indica ser necessária uma maior concentração do composto para haver o mesmo percentual de morte celular em células tumorais.

Na Figura 1, podemos notar que a morte média para as células da linhagem Vero da maior concentração utilizada de ácido oleico (528,8 $\mu g/mL$) foi 82,28 %, enquanto para a maior concentração de ácido palmítico (175 $\mu g/mL$) foi 79,37 %.



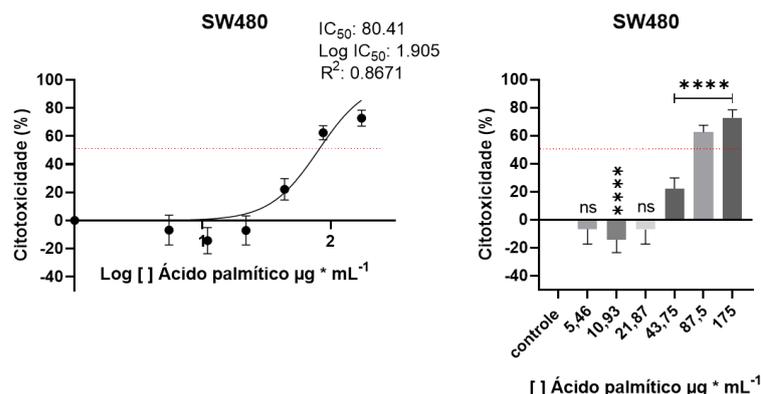


Figura 2 - Citotoxicidade de ácido oleico (gráficos superiores) e de ácido palmítico (gráficos inferiores) nas células SW480 após 48h de tratamento. À direita: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada com os percentuais de células mortas; à esquerda: média \pm dos desvios padrões de três experimentos independentes para cada tratamento, submetidos ao teste de Dunnett (5% de significância).

Na Figura 2, é mostrado que para a linhagem SW480, a morte média da maior concentração de ácido oleico foi 93,69 % e a morte média da maior concentração de ácido palmítico foi 72,84 %. Indicando que estes ácidos graxos atuam de forma diversa na viabilidade celular de linhagens normais e tumorais. O Ácido palmítico se destacou como composto anti-câncer para as linhagens em relação ao ácido oleico, ao apresentar um valor inferior de IC_{50} . Além disto, foi demonstrado um efeito proliferativo na linhagem de câncer colorretal tratada com baixas concentrações de ácido oleico.

A partir dos dados de IC_{50} foi calculado o índice de seletividade entre as linhagens que foi 0,496 para ácido oleico e 0,377 para ácido palmítico. O ácido oleico obteve uma melhor seletividade para SW481. Mas ambos os SI Vero/SW481 foram inferiores ao SI de fármacos convencionais, doxorrubicina (0,5) para câncer colorretal humano (ROCHA E OLIVEIRA, 2019). Desta forma, os ácidos graxos aqui testados demonstraram possuir potencial para o desenvolvimento de um futuro fármaco a ser utilizado no tratamento contra o câncer, mas deve-se ainda fazer mais testes com novas linhagens de modo a identificar.

4 CONCLUSÃO

Baseado nos dados obtidos podemos concluir que os ácidos graxos apresentaram efeito citotóxico nas linhagens celulares, tendo seletividade próxima aos tratamentos comerciais convencionais. Além disto, o ácido palmítico se destacou pelo seu efeito citotóxico na linhagem de câncer colorretal humano, demonstrando potencial para futura utilização como fármaco no tratamento clínico. Devido a isso, torna-se importante sua avaliação em outras linhagens de câncer para averiguar a especificidade do mesmo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

What is cancer? National Cancer Institute (NIH), 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 20 de set.

de 2022.

Estimativa 2020. Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>>. Acesso em: 29 de jul. de 2022.

BAÊTA, Jefferson Viktor de Paula Barros (2019). Síntese e avaliação da atividade antimelanoma in vitro, in silico e in vivo do 2-alil-1, 3-difenil-1, 3-propanodiona. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/25684>>. Acesso em: 03 de set. de 2022.

NASCIMENTO, Fernanda R. et al. New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: cytotoxic effect and direct interaction with DNA. **Biophysical Chemistry**, v. 239, p. 1-6, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301462218300851>>. Acesso em: 11 de set. de 2022. doi: 10.1016/j.bpc.2018.04.009

AMARAL, Ricardo Guimarães et al. Cytotoxic potential of 14 Passiflora species against cancer cells. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 13, n. 7, p. 157-166, 2019. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34695>>. Acesso em: 18 de set. de 2022. doi: 10.5897/JMPR2019.6744

BALLESTEROS-VIVAS, Diego et al. Foodomics evaluation of the anti-proliferative potential of Passiflora mollissima seeds. **Food Research International**, v. 130, p. 108938, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919308245>>. Acesso em: 23 de set. de 2022. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108938

Regis SA, Resende ED De, Antoniassi R (2015) Oil quality of passion fruit seeds subjected to a pulp-waste purification process. **Ciência Rural**, Crop Prod 45:977–984 Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10495-008-0260-3>>. Acesso em: 28 de set. de 2022. doi: 10.1590/0103-8478cr20140099

ROCHA E OLIVEIRA, M.A.B.R. Avaliação da atividade antitumoral in vitro do derivado de dibenzoilmetano, 1-[(4'-iso-propil)fenil]-2-propano-3-fenil-1,3- propanodiona (ip2-dbm), em linhagens de melanoma, glioma e adenocarcinoma do colorretal. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Centro de Física Biológica,