

Ferramentas metodológicas *in vitro* para o estudo do câncer e seleção de novas substâncias antitumorais

Jisette González

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(jise.glez@gmail.com)

Helana Ortiz Garcia

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(helana.garcia@poa.ifrs.edu.br)

Jordânia dos Santos Pinheiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(jordaniaspineiro@gmail.com)

Gustavo Luiz Padilha

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(gustavoluizpadilha@yahoo.com.br)

Vitória Garcia La Porta

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(vitorialaporta@gmail.com)

Gabriel Fernandes Silveira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS)
Campus Porto Alegre
(gabriel.silveira@poa.ifrs.edu.br)

Miriam Anders Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

(miriam.apel@ufrgs.br)

Alessandra Nejar Bruno

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) -

Campus Porto Alegre

(alessandra.bruno@poa.ifrs.edu.br)

Resumo: O câncer é a doença que mais causa mortes no mundo, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública. O século XX se destacou por um avanço na pesquisa de produtos naturais, especialmente oriundos de plantas utilizadas na terapêutica antineoplásica. Estudos *in vitro* podem ser realizados em culturas celulares, possibilitando a caracterização dos mecanismos de ação, eficácia e seletividade de substâncias provenientes de espécies vegetais. Neste trabalho demonstramos alguns resultados obtidos através do tratamento de células de uma linhagem humana de câncer cervical (SiHa) com diferentes preparações oriundas de espécies vegetais nativas (óleos essenciais e extrato bruto aquoso), usando metodologias de fácil execução e economicamente viáveis. Tais metodologias visam a avaliação de parâmetros importantes para o crescimento e estabelecimento de células tumorais, tais como adesão celular, migração, recuperação da viabilidade após a retirada do tratamento e formação de colônias. Nossos resultados demonstraram que tais tratamentos reduziram de forma significativa os parâmetros mencionados, exemplificando a importância das ferramentas metodológicas aqui descritas para a triagem e desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

Palavras-chave: Câncer; Ativos vegetais; Culturas celulares.

***In vitro* methodological tools for the study of cancer and selection of new anticancer molecules**

Abstract: Cancer is the most deadly disease in the world, and is currently one of the most important public health problems in the world. The XX century was highlighted by an advance in the research of natural products, especially from plants used in antineoplastic therapy. *In vitro* studies can be performed in cell cultures, enabling the characterization of mechanisms of action, efficacy and selectivity of substances from plant species. In this work we show some results obtained by the treatment of human cervical cancer cells (SiHa) with different preparations from native plant species (essential oils and crude aqueous extract) using easy to use and economically viable methodologies. Such methodologies intend to evaluate important parameters for the growth and establishment of tumor cells, such as cell adhesion, migration, recovery of viability after treatment withdrawal and formation of colonies. Our results demonstrated that such treatments significantly reduced the mentioned parameters, exemplifying the importance of the methodological tools described herein for the screening and development of new antitumor therapies.

Keywords: Cancer; Plant actives; Cell cultures.

INTRODUÇÃO

O câncer é a doença que mais causa mortes no mundo, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial. É responsável por mais de 7,6 milhões de óbitos por ano, o que representa 13% de todas as causas de morte do mundo (GUERRA e GALLO, 2005).

Esta enfermidade é caracterizada pelo crescimento desordenado e descontrolado de algumas células que se tornam não responsivas aos sinais de controle de proliferação, morte e diferenciação celular, devido, entre outros fatores, a mutações que levam a alterações na expressão ou função de genes-chave importantes para estes processos (ALMEIDA *et al.*, 2005). O câncer também é caracterizado pela destruição do tecido adjacente, bem como pelo crescimento em outros sítios diferentes do tumor primário (metástase) (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Apesar dos inúmeros avanços científicos demonstrados na última década, o tratamento do câncer ainda apresenta uma série de limitações. A intervenção cirúrgica, além de invasiva, muitas vezes não exclui a possibilidade de recorrência do tumor. Além disso, a quimioterapia e radioterapia afetam células tumorais e não tumorais, acarretando em uma vasta gama de efeitos adversos e indesejáveis.

Desta forma, nos últimos anos, há um interesse crescente no desenvolvimento de terapias complementares e novas alternativas às drogas atualmente disponíveis no mercado. Neste contexto, os produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, representam as maiores fontes de substâncias ativas com potencial utilização na terapêutica, e, talvez, a fonte mais antiga de medicamentos já utilizada pelos seres humanos. Entre os medicamentos disponibilizados no mercado, 28% destes possuem princípios ativos isolados de produtos naturais ou semissintéticos, ao passo que 24% são sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais (CHIN *et al.*, 2006; NEWMAN e CRAGG, 2016). Diferentes estudos realizados tanto *in vitro*, quanto em fase pré-clínica e clínica, têm gerado informações úteis sobre a eficácia e segurança de plantas de emprego tradicional.

Moléculas de origem natural têm sido utilizadas como base para o desenvolvimento de moléculas protótipo, possibilitando o delineamento e o

planejamento racional de novos fármacos com novas ações terapêuticas. Podemos mencionar medicamentos conhecidos de origem vegetal, tais como a morfina e a codeína, obtidas de *Papaver somniferum* (BARREIRO, 1990); a digoxina, obtida de espécies de *Digitalis* (FOGLIO *et al.*, 2006); o paclitaxel, obtido de espécies de *Taxus* (WANI, *et al.*, 1971); bem como a vincristina e a vimblastina, obtidas de *Catharanthus roseus* (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Neste cenário, destacamos que o Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo, contando com 20% do número total de espécies do planeta, sendo que muitas dessas espécies são endêmicas (KATO, 2001).

O isolamento, a identificação e os testes das propriedades biológicas de compostos de origem natural para o desenvolvimento de novos medicamentos têm contado com metodologias recentes e cada vez mais modernas e eficientes. Neste sentido, a busca por novos medicamentos com atividade antitumoral tem sido considerada cada vez mais relevante e é dependente de técnicas e métodos que permitam o desenvolvimento de tratamentos que sejam (a) mais efetivos e que impeçam o avanço da doença; (b) seletivos; (c) economicamente viáveis e, portanto, acessíveis; (d) de fácil administração e (e) com poucos ou insignificantes efeitos colaterais.

Tais estudos envolvem um esforço multidisciplinar dos pesquisadores de diferentes áreas e iniciam com a identificação e coleta das espécies vegetais a serem testadas; a preparação das amostras das substâncias vegetais; a identificação química das mesmas e procede-se com os estudos *in vitro*. Tais estudos se caracterizam pela utilização de culturas celulares, possibilitando a caracterização da atividade citotóxica e eficácia destas amostras, a sua seletividade e verificação do seu mecanismo de ação. Testes com culturas celulares são viáveis e reprodutíveis e, portanto, podem ser utilizados com sucesso para a realização destes ensaios. Além disto, muitas linhagens de células tumorais de diferentes tecidos estão disponíveis para a realização de distintos ensaios biológicos. Os estudos com células tumorais mediante algum tratamento devem avaliar a viabilidade e morfologia destas células, além de parâmetros relevantes para a sobrevivência, estabelecimento das mesmas em um determinado ambiente. Os principais parâmetros celulares a serem analisados envolvem: (a) a capacidade de proliferação; (b) adesão celular; (c) migração celular; (d) capacidade de formação de

novos vasos sanguíneos (angiogênese); (e) análise dos mecanismos de morte celular; (f) capacidade de formação de colônias; (g) capacidade de recuperação (resistência).

A migração de células tumorais também tem sido extensivamente estudada devido à sua importância no processo de metástase (YAMAGUCHI *et al.*, 2005). Metástases são facilitadas por interações célula-célula entre as células tumorais e as células do endotélio que contribuem para a adesão de células tumorais, seu extravasamento, e, portanto, no estabelecimento de lesões metastáticas (BENDAS e BORSIG, 2012).

Também é importante considerar que, no ambiente tumoral, algumas células mantêm a capacidade de proliferação e de formação de novos tumores mesmo mediante tratamento (FIEBIG *et al.*, 2004), sendo, por isso, importante a verificação da capacidade de recuperação das células tumorais após a retirada de um tratamento como um indicativo acerca da probabilidade de recorrência de um determinado tumor. As células tumorais também possuem a capacidade de se proliferar formando colônias (capacidade clonogênica). Assim, a capacidade clonogênica das células tumorais é um parâmetro importante sobre a malignidade dessas células e, portanto, o acompanhamento de tal característica é uma ferramenta potencial para a avaliação dos possíveis efeitos antitumorais dos tratamentos a serem testados.

Desta forma, neste artigo demonstraremos alguns resultados obtidos através de ferramentas metodológicas *in vitro* envolvendo culturas de células tumorais que sejam de simples execução, economicamente viáveis e que tragam informações relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias antitumorais. Para tanto, foi utilizada a linhagem celular neoplásica escamosa proveniente de carcinoma de cérvix uterino humano, denominada SiHa. O câncer de colo de útero constitui o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres e o sétimo na classificação geral (PARKIN e BRAY, 2006), possuindo alta morbimortalidade, o que justifica a realização de estudos acerca de possíveis terapias alternativas às atuais. As células serão tratadas com dois óleos essenciais e um extrato aquoso bruto de duas espécies vegetais do Rio Grande do Sul.

METODOLOGIA

Materiais

Gentamicina, fungizona (Anfotericina B) e soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos de Gibco BRL (Grand Island, NY). O meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), tripsina/EDTA, o corante Azul de Tripán e o sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) foram adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de alto grau de pureza.

Linhagens celulares

A linhagem de origem neoplásica escamosa da cérvix uterina humana (SiHa) foi obtida da “American Type Culture Collection” (ATCC, USA). As células foram mantidas em meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, e mantidas em estufa de CO₂ a 5% e 37°C.

Tratamentos

As células tumorais acima mencionadas foram plaqueadas para cada ensaio (como será descrito abaixo) e tratadas com um dos tratamentos a seguir: extrato bruto aquoso (EBA) e um óleo essencial (OE 1) de uma espécie vegetal da família *Myrtaceae* e dois óleos essenciais (OE 2 e OE 3) de uma espécie vegetal da família *Asteraceae*. Tais espécies vegetais não foram especificadas aqui por motivos de intenção de depósito de patente. Para utilização dos óleos essenciais, estes foram solubilizados no veículo propilenoglicol, sendo o OE 1 solubilizado na proporção de 1:10 e o OE 2 e OE 3 na proporção de 1:5. Em todos os ensaios foi utilizada a concentração inibitória média (IC 50) dos tratamentos, sendo de 7,1 mg/mL para o EBA, 2,1 µg/mL para o OE 1 e 72 ng/mL e 83 ng/mL para o OE 2 e OE 3, respectivamente. Poços controles (apenas meio de cultura DMEM) e poços controle veículo (meio de cultura DMEM e propilenoglicol na concentração correspondente) foram realizados em todos os experimentos.

Ensaio de adesão celular

Ensaio que permitam a análise do processo de adesão celular são de grande importância para a verificação do comportamento patológico de células tumorais, já que estas células diferem de células normais pela sua habilidade em alterar o comportamento, organização e distribuição de moléculas de adesão celular visando o favorecimento de processos como migração e invasão celular (ROSSETTI *et al.*, 2015).

Para verificar o efeito do tratamento com o óleo essencial (OE 3) sobre a capacidade de adesão celular, o mesmo foi adicionado na concentração de IC50 juntamente com o plaqueamento na densidade de 1×10^4 células por poço da linhagem tumoral SiHa. Posteriormente, a placa foi incubada em estufa de CO₂ a 5% e 37 °C por 4 horas. A seguir, o sobrenadante dos poços foi coletado, em duplicata, e a placa lavada duas vezes com tampão fosfato (PBS) à temperatura ambiente (TA), sempre transferindo a solução tampão para o respectivo tubo. Após, o conteúdo da coleta de todos os poços foi centrifugado a 1.200 rpm por 5 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi ressuscitado juntamente com o corante de exclusão Azul de Tripán e as células viáveis foram contadas em hemocítômetro.

Concomitantemente, foi realizado o ensaio de viabilidade celular com cristal violeta que, por sua vez, avalia as células viáveis que estão aderidas nos poços. Após coleta do sobrenadante, as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos e a seguir, coradas com cristal violeta 0,5% (solubilizado em metanol) por 10 minutos. Para retirada do excesso de cristal, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x. Por último, o corante foi eluído em ácido acético 30% e quantificado em leitor de placa a 570 nm.

Ensaio de migração celular

O processo de migração celular está diretamente ligado à formação de metástase pelas células tumorais *in vivo*. A capacidade de migração celular pode ser avaliada através do ensaio de *Wound Healing* como descrito por Rodriguez *et al.* (2005) e baseia-se na observação de que, após a criação de uma 'ferida' sobre uma monocamada de células confluentes, as células sobre a borda desta ferida irão se

mover na direção da abertura até que novos contatos célula-célula sejam estabelecidos novamente (LIANG *et al.*, 2007).

Para a realização deste ensaio, células SiHa foram plaqueadas (3×10^4 células/ poço) em placa de 24 poços e incubadas em estufa de CO₂ até a formação de uma monocamada celular. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado e foi realizada uma ruptura na monocamada com ponteira estéril, em cada poço. A seguir, as células foram lavadas com PBS e cada poço fotografado. O tratamento com EBA na concentração de IC50 foi, então, adicionado aos poços na concentração adequada e a placa incubada durante 24 horas. Após esse período, o tratamento foi retirado e as células foram lavadas com PBS e fotografadas novamente. Para quantificação foi utilizado o *software* ImageJ para a determinação da largura da ruptura na monocamada antes e depois do tratamento através do registro fotográfico.

Ensaio de avaliação da capacidade de formação de colônias

A capacidade de formação de colônias após tratamento de uma população tumoral está associada com a recorrência de um determinado tumor, e possivelmente com a resistência destas células ao tratamento utilizado. Dessa forma, o estudo deste parâmetro celular se torna tão importante e pode ser avaliado pelo chamado ensaio Clonogênico, o qual permite, de uma forma prática, detectar células que tenham mantido a capacidade de produzir unidades formadoras de colônia após a exposição a tratamentos específicos (BROWN e ATTARDI, 2005).

Para este ensaio as células foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço em placa de 24 poços. Após adesão das mesmas, realizou-se o tratamento com OE 1 na concentração de IC50 por 24 horas. Posteriormente, o tratamento foi retirado dos poços, as células foram lavadas com PBS 1x, tripsinizadas e contadas em hemocítômetro para replaqueamento em placa de 24 poços (300 células por poço) e incubadas por 7 dias em estufa de CO₂. Após esse tempo, foi realizada a marcação das colônias para contagem. Primeiramente as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Em seguida, o paraformaldeído foi descartado e cristal violeta 0,5% (solubilizado em metanol) foi adicionado à placa por 10 minutos. Para retirada do excesso de cristal violeta, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x. Para

quantificação do resultado, os poços foram fotografados, as colônias contadas e o resultado expresso como fração de sobrevivência (SF), obtida da seguinte forma: SF = número de colônias formadas × PE (*Plating efficiency*) / número de células semeadas. Onde PE = (número de colônias formadas/ Número de células semeadas) × 100% (FRANKEN *et al.*, 2006).

Ensaio de avaliação da capacidade de recuperação da viabilidade celular

A capacidade de recuperação da viabilidade celular após a retirada do tratamento foi avaliada através do ensaio *Washout*. Considerando que algumas das células de tecido tumoral possuem a capacidade de proliferar e formar novos tumores, a investigação da capacidade de recuperação da viabilidade celular após a retirada do tratamento é um importante indicativo da efetividade das estratégias terapêuticas estudadas. Para a realização deste ensaio, células SiHa foram plaqueadas na densidade de $2,8 \times 10^4$ por poço em uma placa de 24 poços e, após adesão, foram tratadas com OE 2 na concentração de IC50 por 24 horas. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS para retirada efetiva do tratamento, tripsinizadas, contadas e replaqueadas em placa de 96 poços na densidade de 2.800 células por poço. Após 4 dias o ensaio de MTT é realizado para análise da viabilidade celular. Neste ensaio o sal MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) é metabolizado no interior de mitocôndrias de células viáveis onde é reduzido até o produto formazan. MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado à placa durante 3,5 horas e os cristais formados solubilizados em DMSO para quantificação em leitor de placa a 545 e 630 nm. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

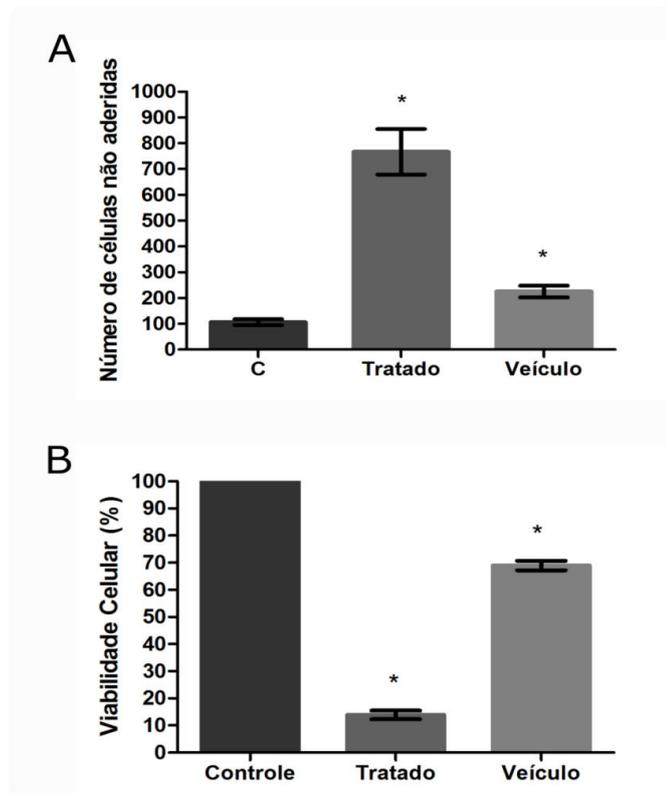
RESULTADOS

Efeito do tratamento sobre a capacidade de adesão das células tumorais

A capacidade de adesão de uma célula tumoral é essencial e determinante para sua sobrevivência e estabelecimento num ambiente. O óleo essencial aqui testado aumentou o número de células viáveis e não aderidas da linhagem SiHa em 719,1% em relação às células controle (Figura 1A). Além disso, o método de

viabilidade celular por cristal violeta, mostrou que apenas 13,87 % das células estavam aderidas após 4 horas de tratamento com OE 3 (Figura 1B).

Figura 1 - Óleo essencial da família Asteraceae diminui a capacidade de adesão das células tumorais. (A) Análise do número de células viáveis e não aderidas no sobrenadante após 4 horas de tratamento com OE 3 na concentração de IC50 de 82 ng/mL. (B) Quantificação das células aderidas, após tratamento, através de marcação com cristal violeta. Os dados mostram a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes realizado em duplicata. * $P < 0.05$: estatisticamente significativo em relação ao controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey).

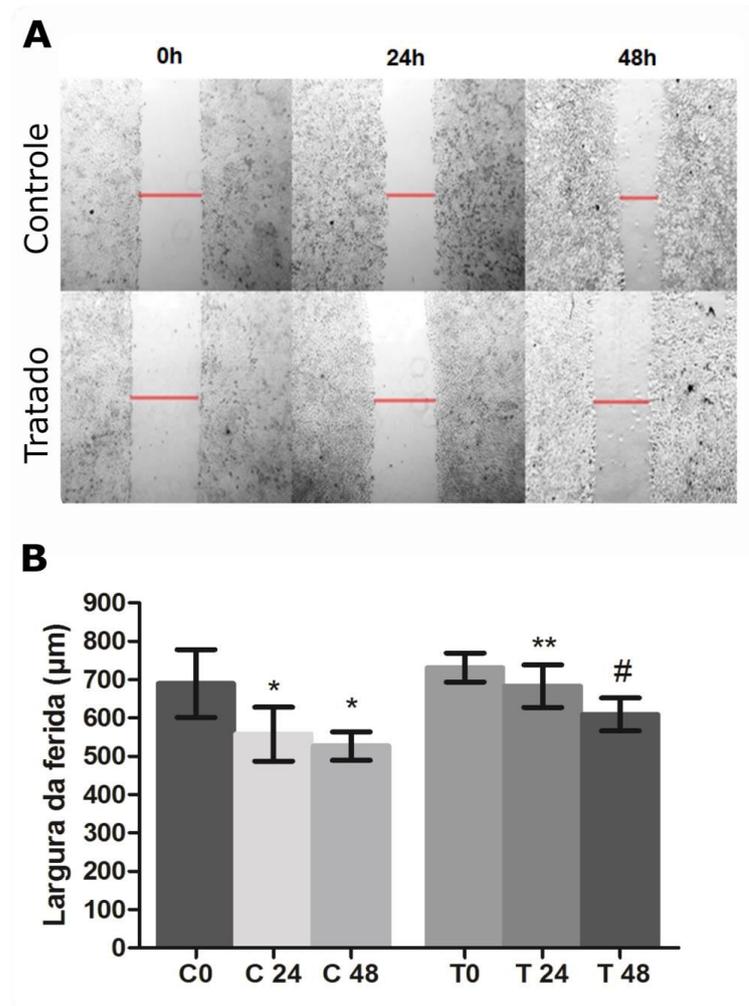


Efeito do tratamento sobre a capacidade de migração das células tumorais

O ensaio *Wound Healing* se baseia na capacidade das células de migrarem após a criação de uma separação física visando a necessidade de estabelecimento de novos contatos célula-célula. Neste experimento, foi realizada uma ferida na monocamada de células SiHa controle e tratadas com EBA por 24 e 48 horas utilizando a concentração de IC50 de cada tratamento. A largura da ferida foi monitorada antes, durante e após o tratamento.

Na Figura 2A podemos observar o registro fotográfico da ferida na monocamada durante o experimento, sendo evidente a diminuição na largura da ferida das células controle e uma maior manutenção da largura inicial nas células tratadas com EBA. Estes dados demonstraram uma diminuição significativa na migração das células tumorais em 63,4% após 24 horas e 24,5% após 48 horas em relação às células controle (Figura 2 B).

Figura 2 - Extrato bruto aquoso (EBA) da família *Myrtaceae* altera a capacidade de migração das células tumorais. (A) Figuras representativas e (B) medidas da largura da ferida da linhagem SiHa após 24 e 48 horas de tratamento com EBA na concentração de IC50 (7,8 mg/mL). Os dados mostram a média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle antes do tratamento (C0), ** P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle depois de 24 horas (C24), # P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle do tratamento (CT) (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey).

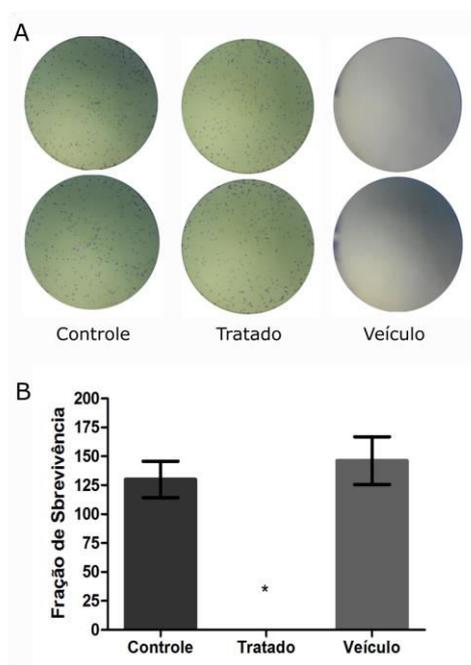


Efeito do tratamento sobre a capacidade de formação de colônias das células tumorais

Outro parâmetro importante para a sobrevivência de uma célula tumoral é a capacidade de formação de novas colônias de células. Neste ensaio as células submetidas ao tratamento na concentração de IC50 com o OE 1 por 24 horas, foram posteriormente replaqueadas em baixa densidade e incubadas em condições padrão durante 7 dias.

Foi possível observar que o tratamento com OE 1 foi capaz de inibir de forma significativa a capacidade de formação de colônias das células tumorais submetidas ao tratamento. Enquanto isso, as células controle e controle veículo apresentaram um SF de 130 e 146,2 respectivamente, demonstrando que o veículo utilizado não foi capaz de interferir na capacidade de formação de colônia da mesma forma que o tratamento (Figura 3).

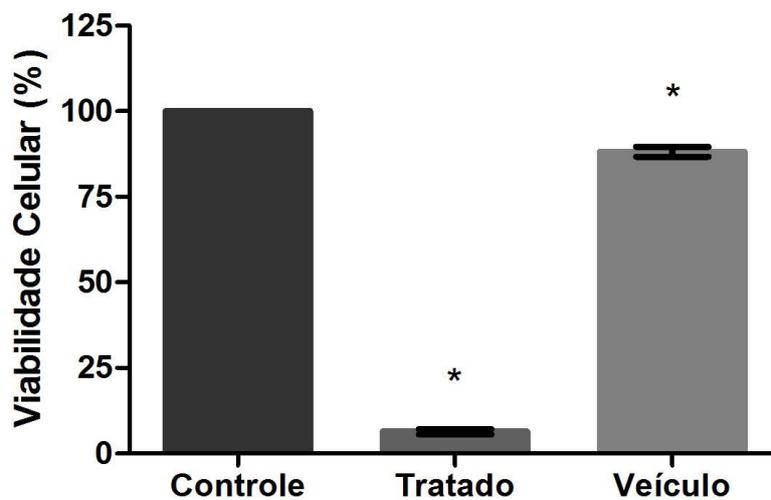
Figura 3 - Óleo essencial da família *Myrtaceae* inibe a capacidade de formação de colônias das células tumorais. (A) Figuras representativas e (B) quantificação dos efeitos do OE 1 na concentração de IC50 (2,1 ug/mL) sobre a capacidade clonogênica das células tumorais após 24 horas de tratamento. Os dados mostram a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes realizado em duplicata. * P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey).



Efeito do tratamento sobre a capacidade de recuperação da viabilidade das células tumorais

A capacidade de recuperação da viabilidade das células tumorais após retirada do tratamento pode dar um indicativo acerca da probabilidade de recorrência de um determinado tumor. Assim, após a retirada do OE 2 na concentração de IC50, os dados demonstraram que apenas 6,36% das células recuperaram sua viabilidade em relação às células controle (Figura 4).

Figura 4 - Óleo essencial da família *Asteraceae* diminui a capacidade de recuperação da viabilidade das células tumorais após retirada do tratamento. Análise da viabilidade celular por MTT após realização do ensaio *Washout* com a concentração de IC50 (72 ng/mL) do OE 2 por 24 horas de tratamento. Os dados mostram a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * P <0.05: estatisticamente significativo em relação ao controle. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey).



DISCUSSÃO

Atualmente, o potencial extraordinário para a descoberta de novos fármacos antitumorais provenientes de fontes naturais tem sido reconhecido em função da existência de um grande número de espécies disponíveis para investigação. Até o momento, estima-se que menos de 2% dos vegetais superiores foram analisadas para detecção de constituintes com atividade antineoplásica (NEWMAN *et al.*, 2000).

A oncologia experimental procura estudar os mecanismos de desenvolvimento das neoplasias em modelos experimentais, assim como encontrar as possíveis formas de tratá-las. As estratégias para a descoberta de novos fármacos têm mudado ao longo dos anos. Atualmente, os programas de prospecção incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas e para isso, um conjunto de ferramentas metodológicas, protocolos e experimentos específicos têm se mostrado indispensáveis para a determinação do potencial real de algum tratamento antineoplásico. Desta forma, este artigo descreve alguns resultados obtidos em nosso laboratório através de metodologias viáveis, confiáveis e de fácil execução para a análise de novos alvos terapêuticos potencialmente antitumorais. Os ensaios aqui descritos são de grande relevância para a análise de parâmetros-chave relacionados aos processos de proliferação, expansão e viabilidade de células tumorais submetidas a um determinado tratamento.

Como exemplo, podemos mencionar ensaios que permitem a análise do processo de adesão celular, já que se sabe que as células tumorais diferem de células normais pela sua habilidade em alterar o comportamento, organização e distribuição de moléculas de adesão celular, tais como selectinas, superfamília de imunoglobulinas, caderinas e integrinas. A alteração da expressão de proteínas de adesão pode também alterar processos como proliferação, invasão e metástase (ROSSETTI *et al.*, 2015). Assim, a análise da expressão destas proteínas é importante para determinar o potencial antineoplásico de alguma droga em teste. Entretanto, para tais análises é indispensável a utilização de anticorpos específicos que são de alto custo e necessitam de equipamentos adequados que nem sempre estão disponíveis em todos os laboratórios de pesquisa. Por este motivo, nós descrevemos aqui um ensaio capaz de trazer informações sobre o processo de adesão celular e por sua vez, determinar o comportamento de células tumorais em relação a este parâmetro durante um tratamento em estudo. Como podemos observar na Figura 1A, o processo de adesão das células tumorais foi reduzido de forma significativa após o tratamento com o OE 3. O ensaio com cristal violeta (Figura 1B), capaz de avaliar a viabilidade das células aderidas ao poço, corroborou o resultado demonstrado na Figura 1A, já que também demonstrou uma inibição significativa do processo de adesão induzido pelos tratamentos estudados. Desta forma, a capacidade de adesão celular pode ser estudada através destas técnicas

de forma eficiente e com baixo custo. O estudo deste parâmetro é de grande importância para a análise da capacidade de sobrevivência de células tumorais após a aplicação de um determinado tratamento, já que uma célula com comprometimento no processo de adesão é incapaz de se estabelecer em um determinado ambiente. Este dado é evidentemente importante no ambiente de um tumor sólido, como é o caso do câncer de colo de útero, onde o processo de adesão é capaz de assegurar a expansão e o crescimento deste tumor.

Considerando a contribuição dos processos de adesão e migração em metástases tumorais, também foi avaliada a capacidade de migração das células de linhagem tumoral após tratamento. O ensaio *Wound Healing*, proposto por Rodriguez *et al.* (2005), configura uma alternativa simples e economicamente viável para a avaliação deste importante parâmetro. Como demonstrado na Figura 2, o tratamento promoveu uma redução significativa na motilidade das células tumorais em relação ao controle. Estes resultados são de grande relevância, visto que a capacidade de migração das células tumorais está intimamente relacionada com a capacidade invasão destas células, e conseqüentemente, exibe um papel chave no processo metastático. A capacidade de migração celular também pode ser avaliada através do ensaio de Câmara de Boyden. Este ensaio consiste na aplicação de suspensões de células tratadas sobre uma membrana semipermeável e posterior quantificação daquelas capazes de atravessar a membrana até um compartimento inferior. Além de possuir custo mais elevado, esta técnica não permite o estudo da regulação do processo migratório por interações célula-célula e célula-matriz extracelular (LIANG *et al.*, 2007).

Outro parâmetro importante a ser considerado diz respeito ao fato de que após um tratamento com radioterapia ou quimioterapia, uma população celular sobrevivente pode recuperar a sua capacidade proliferativa e retomar o crescimento da massa tumoral. Esse grupo de células é predominantemente formado por células-tronco tumorais, que se caracterizam por sua capacidade de divisão ilimitada e por este motivo, constituem o alvo primário das terapias contra o câncer (FIEBIG *et al.*, 2004). A capacidade de formação de colônias, ou capacidade clonogênica, está estritamente associada com a recorrência de tumores na clínica, e por este motivo, o estudo deste parâmetro é de suma importância em ensaios *in vitro*. Como evidenciado na Figura 3A e B o tratamento com o óleo essencial da espécie da

família Myrtaceae foi capaz de induzir uma diminuição expressiva da capacidade de formação de colônias das células tumorais.

O ensaio *Washout* é também uma ferramenta importante na determinação da capacidade de recuperação celular após a retirada de um determinado tratamento, podendo demonstrar a presença de uma modulação crônica e prolongada do tratamento em teste. Este parâmetro está relacionado com a capacidade de recidiva de um determinado tumor após a suspensão ou redução da dose de um determinado tratamento. Na Figura 4 podemos observar que o tratamento foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das células tumorais após a retirada do mesmo. Isso torna a estratégia terapêutica promissora no sentido de reduzir a probabilidade de recorrência do tumor em estudo.

Além dos ensaios aqui descritos, é possível lançar mão de outras ferramentas metodológicas para a avaliação do potencial antineoplásico de biocompostos, aqui não explicitadas por limitação de espaço, mas já padronizadas por nosso grupo de pesquisa. Essas ferramentas podem também fornecer informações relevantes acerca da influência de determinado tratamento em outros parâmetros, como a análise do mecanismo de morte celular induzido por um composto bioativo. Uma técnica amplamente utilizada visa a marcação das células tratadas com a proteína anexina V conjugada a um fluorocromo e posterior quantificação por citometria de fluxo. Esta técnica baseia-se na exposição do fosfolípido fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática de células em processo de apoptose (FADOK *et al.*, 1998). A anexina V, por possuir alta afinidade por fosfatidilserina, adere-se à superfície das células em processo de apoptose inicial, antes do surgimento das características morfológicas inerentes a este processo. Para otimização da técnica, é comum a marcação concomitante com iodeto de propídio, um marcador fluorescente nuclear capaz de penetrar apenas em células com alteração na permeabilidade de membrana, como é o caso de células necróticas. Dessa forma, é possível distinguir as células viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia ou necrose (HINGORANI *et al.*, 2011).

Para a análise do mecanismo de morte celular, também é possível utilizar outras metodologias que não requerem o uso de equipamentos sofisticados como o citômetro de fluxo, sendo, portanto, mais viáveis economicamente. Uma delas é a análise da morfologia nuclear através de corantes fluorescentes, como o corante

fluorescente Hoechst® 33258, onde, após o tratamento, as células são coradas e analisadas em microscópio de fluorescência para a verificação da condensação da cromatina, como indicativo de uma possível morte celular via apoptose (ONOZAWA *et al.*, 1998).

CONCLUSÃO

As metodologias aqui descritas possibilitaram a obtenção de resultados capazes de confirmar o potencial antineoplásico dos tratamentos testados através de técnicas simples, economicamente viáveis e de fácil execução. Estes resultados podem ser considerados promissores e enfatizam a importância de estudos adicionais envolvendo ativos vegetais como novas alternativas antineoplásicas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. L. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- BARREIRO, E. J. **Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos.** *Quim. Nova*, v. 13, n. 1, p. 29–39, 1990.
- BENDAS, G.; BORSIG, L. **Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins.** *International Journal of Cell Biology*, v. 2012, n. 1, 2012.
- BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. **Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas.** *Quim. Nova*, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.
- BROWN, J.M.; ATTARDI, L.D. **The role of apoptosis in cancer development and treatment response.** *Nat. Rev. Cancer*, n. 5, p. 231–237, 2005.
- CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. **Drug discovery from natural sources.** *The AAPS J.* v. 8, n. 2, p. E239– 53, 2006.
- FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; FRASCH, S. C.; WARNER, M. L.; HENSON, P. M. **The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes.** *Cell Death and Differentiation*, v. 5, n. 7, p. 551–562, 1998.

FRANKEN, N.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. **Clonogenic assay of cells in vitro**. *Nature Protocols*, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FIEBIG, H. H.; MAIER, A.; BURGER, A. M. **Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery**. *European Journal of Cancer*, v. 40, n. 6, p. 802–820, 2004.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, M. I. O.; RODRIGUES, R. A. F. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar**. *Multiciências*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2006.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M. **Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes**. *Rev Bras Cancer*, v. 51, n. 3, p. 227–234, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The hallmarks of cancer**. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HINGORANI, R.; DENG, J.; ELIA, J.; MCINTYRE, C.; Mittar, D. **Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ System**. San Jose: BD Biosciences, 2011, 12p.

KATO, M. J. **Global phytochemistry: the Brazilian approach**. *Phytochemistry*, v. 57, n. 5, p. 621–3, 2001.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro**. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014**. *J. Nat. Prod*, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. **The influence of natural products upon drug discovery**. *Nat Prod Rep.*, v. 17, p. 215–234, 2000.

ONozAWA, M.; FUKUDA, K.; OHTANI, M.; AKAZA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. **Effects of Soybean Isoflavones on Cell Growth and Apoptosis of the Human Prostatic Cancer Cell Line LNCaP**. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 6, p. 360–363, 1998.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. **Chapter 2: The burden of HPV-related cancers**. *Vaccine*, v. 24, n. 3, 2006.

RODRIGUEZ, L.G.; WU, X.; GUAN, J.L. **Wound-healing assay**. *Methods in Molecular Biology*, v. 294, p. 23–29, 2005.

ROSSETTI, C.; REIS, B.; DELGADO, P. O.; AZZALIS, L. A.; JUNQUEIRA, V. B. C.; FEDER, D.; FONSECA, F. **Adhesion molecules in breast carcinoma: a challenge to the pathologist.** *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 61, n. 1, 2015.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. **Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 93, n. 9, p. 2325–2327, 1971.

YAMAGUCHI, H; WYCKOFF, J; CONDEELIS, J. **Cell migration in tumors.** *Current Opinion in Cell Biology*, v. 17, n. 5, p. 559–64, 2005.