

Avaliação Comparativa do Efeito Citotóxico de Lupeol e Lipossomas Contendo Lupeol em Células K-562 e Curva de Sobrevida.

Alexandre Pereira dos SANTOS, Marize Campos Valadares BOZINIS, Livia Palmertson MENDES, Eliana Martins LIMA, José Realino de PAULA.

Universidade Federal de Goiás- Faculdade de Farmácia – LFTC/FarmaTec

Email: alexpsfar@hotmail.com

Palavras-chave: Lupeol, Lipossoma, Sucupira-Branca, K-562.

Introdução

Milhares de plantas contendo triterpenos pentacíclicos, têm sido empregadas na medicina. Tais substâncias têm despertado o interesse, devido ao amplo espectro de atividades biológicas (OVESNA; VACHÁLKOVA; HORVÁTHOVÁ, 2004). Também classificados como fitoestéroides estes compostos representam importância estrutural nas membranas celulares das plantas. Nesse contexto, o triterpeno Lupeol, tem-se destacado no cenário científico, principalmente no que tange aos estudos envolvendo a descoberta de compostos antitumorais e antiinflamatórios. (SALEEM, 2009).

O Lupeol é encontrado em vários vegetais como uvas, morangos, manga, azeite e figo (ERAZO et al., 2008; SALEEM, 2009). Trabalho realizado por Moraes (2007) verificou a presença de Lupeol nas cascas do caule de uma planta típica do Cerrado brasileiro, *Pterodon emarginatus* Vogel. conhecida como Sucupira-Branca.

Várias investigações têm sido realizadas para avaliar a ação do Lupeol frente a células tumorais (SALEM, 2009). Foi verificada a indução de apoptose em células de leucemia mielóide aguda HL-60, redução da viabilidade das células 451 Lu e WM35 (SALEM et al., 2008). Foram observados ainda efeitos citotóxicos nas linhagens Vero, B₁₆F10 e HEP-2 (BADAMI et al., 2003), inibição de células em crescimento de melanoma em camundongos e células leucêmicas, indução da apoptose Fas-mediada em câncer de próstata (SIDDIQUI et al., 2007). Cmoch (2008) verificou a indução da morte de linhagens celulares de várias origens histopatológicas incluindo: Leucemia T-linfoblástica CEM, Carcinoma de Mama MCF-7, Carcinoma de Pulmão A-459, Mieloma Múltiplo RPMI 8226, Carcinoma Cervical HeLa e Melanoma maligno G361, quando estas foram tratadas por um período de 72 horas.

Diante do exposto, e por não existirem estudos com mecanismos farmacêuticos de entrega para o Lupeol, o presente trabalho avaliou e comparou o

efeito citotóxico do Lupeol e do Lipossoma contendo Lupeol em células leucêmicas K-562, além de verificar a sobrevivência de camundongos quando estes foram tratados com o Lupeol.

Materiais e Métodos

Obtenção do Lupeol e Lipossoma

O isolamento do Lupeol foi realizado a partir do extrato etanólico bruto das cascas do caule de *P. emarginatus* coletas no município de Bela Vista-GO, a espécie foi identificada pelo Prof. Dr. José Realino de Paula e a exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob n. 27.155. Para a obtenção do Lupeol procedeu-se a partição líquido-líquido do extrato, seguida de coluna cromatográfica da fração hexânica. Os Lipossomas contendo Lupeol foram fornecidos pelo FarmaTec- Laboratório de Nanotecnologia da Universidade Federal de Goiás.

Linhagens Celulares

Foi utilizada a linhagem humana K-562, proveniente do “American Type Culture Cell Collection”, Rockville, Maryland, USA. Tais células foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 (Sigma™, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab™) e 1% de L-glutamina, eritromicina e estreptomicina (Sigma) em estufa com 5% de CO₂ e temperatura controlada de 37 °C

A linhagem Tumoral de Ehrlich foi mantida nas dependências do laboratório através de passagens sucessivas, intraperitoniais, entre animais.

Avaliação do potencial citotóxico

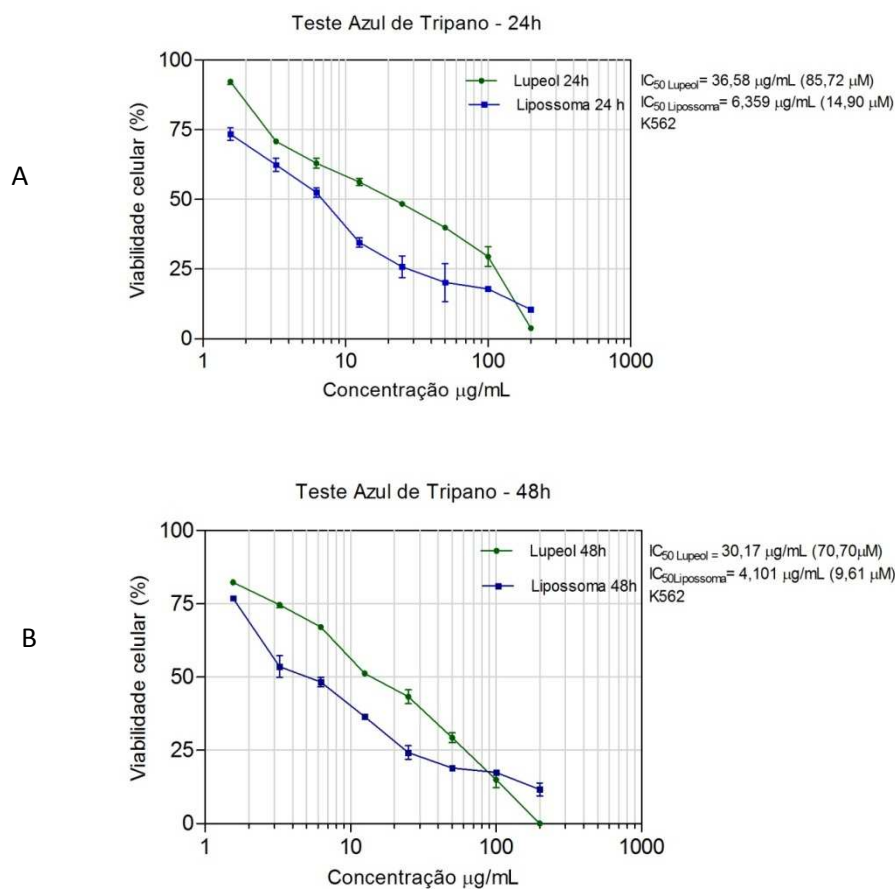
Para realização do estudo de citotoxicidade sobre células leucêmicas K-562, as quais apresentam fenótipo de resistência a fármacos, foi empregado o método de viabilidade por azul de tripano que avalia a integridade da membrana. Para o ensaio, as células (1×10^6) foram incubadas em placas de 96 poços em estufa úmida com 5% de CO₂, por 24, 48 e 72 horas. O teste foi realizado em triplicata, com dois experimentos independentes. Oito concentrações de Lupeol e Lipossoma foram testadas variando de 100 – 0,78 µg/mL. Após os respectivos tempos de incubação, as células viáveis foram contadas em microscópio óptico, utilizando Câmara de Neubauer. A partir dos dados obtidos foram construídos os gráficos e calculadas as concentrações inibitórias (IC₅₀) utilizando o Software GraphPad Prism 5.0

Realização da curva de sobrevida

O estudo dos efeitos do tratamento com Lupeol foi realizado através da avaliação da curva de sobrevida em camundongos Swiss (Comitê de Ética 137/2009) inoculados com o tumor Ehrlich (6×10^6 células) após tratamento com diferentes concentrações. As concentrações administradas intraperitonealmente foram de 500, 250 e 125 mg/Kg. Cada grupo foi composto de 6 animais. O tratamento com Lupeol ocorreu durante 10 dias e os animais foram analisados por 30 dias. Iniciado o tratamento, os animais foram observados diariamente e as mortes de cada animal dos diferentes grupos foram registradas. A partir dos resultados foi construída a curva de sobrevida de Kaplan Meier, utilizando o Software GraphPad Prism 5.0

Resultados e Discussão

O efeito da citotoxicidade do Lupeol e Lipossomas contendo Lupeol, em células k-562, pode ser observado nas Figuras 1.a, 1.b e 1.c. No tempo de 24 horas o IC_{50} para o Lupeol e Lipossoma foi de $85,72 \mu\text{M}$ e $14,90 \mu\text{M}$, em 48 horas de $70,70 \mu\text{M}$ e $9,61 \mu\text{M}$, e em 72 horas de $65,54 \mu\text{M}$ e $4,77 \mu\text{M}$, respectivamente.



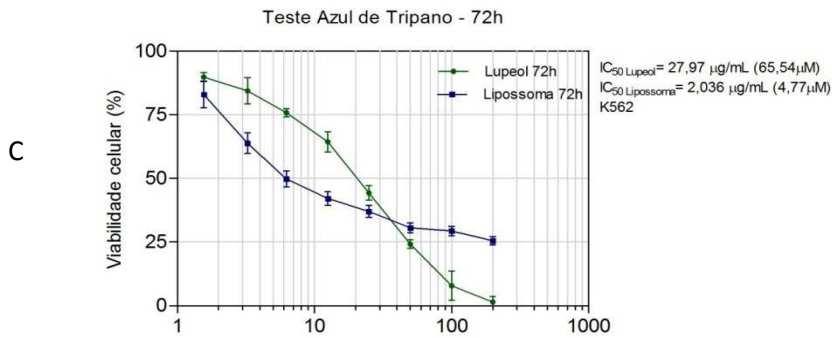


Figura 1.a, 1.b e 1.c - Viabilidade celular em K-562 após 24, 48 e 72 horas, respectivamente após exposição ao Lupeol e Lipossomas contendo Lupeol em diferentes concentrações (100 – 0,78 µg/mL) pelo método azul de tripano. Cada ponto representa a média da triplicata ± DP.

A partir dos resultados é possível inferir que a entrega do triterpeno nas células tumorais ocorreu maneira concentração-tempo-dependente. A terapia com antineoplásicos causa toxicidade sistêmica, resultando em citotoxicidade para as células normais. Uma estratégia alternativa para estes inconvenientes é o uso de lipossomas como carreadores de fármacos antineoplásicos. (MAMOT et al., 2003), que de forma seletiva podem aumentar o efeito citotóxico sobre as células tumorais, como observamos.

Através da curva de sobrevida (Figura 2), foi possível observar que o tratamento com o Lupeol nas concentrações utilizadas aumentou a sobrevida dos mesmos de maneira concentração tempo-dependente quando comparados ao controle. A concentração de 500 mg/kg promoveu um aumento de 50% na sobrevida em relação ao controle.

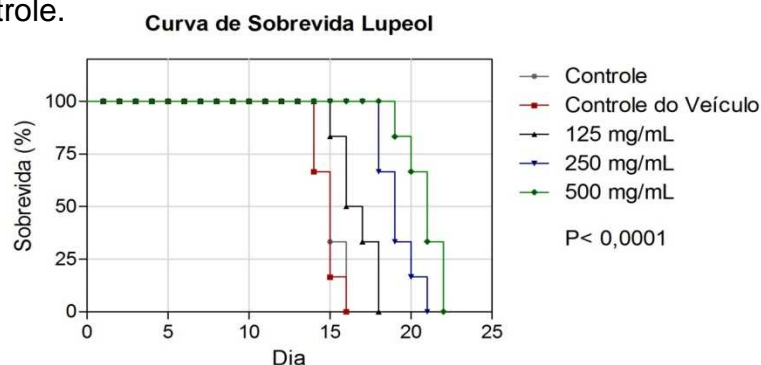


Figura 2 - Curva de sobrevida (Kaplan-Maier) de animais inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com Lupeol (125; 250 e 500 mg/kg/dia) por dez dias consecutivos. Log-rank ($P=0,0001$).

Conclusões

Em conclusão, os dados apresentados sugerem que o Lupeol apresenta relevante atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. E que o Lipossoma contendo Lupeol aumentou de forma significativa o efeito antitumoral. O desenvolvimento de lipossomas contendo Lupeol emerge com inúmeras possibilidades, entre as quais o tratamento do câncer.

Referências Bibliográficas

BADAMI, S. ; VIJAYAN, P. ; MATHEW, N. ; CHANDRASHEKHAR, R. ; GODAVARTHI, A. ; DHANARAJ, S. A. ; SURESH, B. ; In vitro cytotoxic properties of *Grewia tiliaefolia* bark and lupeol. **Indian journal of pharmacology**. v. 35, n.4, p. 250-251, 2003.

CMOCH, P.; PAKULSKI, Z.; SWACZYNOVÁ, M. Synthesis of lupine-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. **Carbohydr**, v.343, p.995-1003, 2008.

ERAZO, R. G. ZALDIVAR, M. DELPORTE, C. BACKHOUSE, N. C. Active metabolites from *Dunalia spinosa* resinous exudates. **Für Nat. C** . v. 63, p.492-496, 2008.

MAMOT, C. ; DRUMMOND, D. C. ; HONG, K. ; KIRPOTIN, D.B.; PARK, J. W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. **Drug Res. Update**, Amsterdam,v. 6, p. 271-279, 2003.

MORAES, W.F. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato etanólico, frações e substância isolada da casca do caule de *Pterodon emarginatus* vog. (sucupira). Goiânia, 104p. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal de Goiás.

OVESNÁ, Z; VACHÁLKOVÁ, A.K.; HORVÁTHOVÁ, D. Pentacíclicos triterpenoic, ácidos: chemoprotective novos compostos. **Neoplasma**, 2004.

SALEM, M.; MADDODI, N.; ZAID, M. A.; KHAN, N.; HAFEEZ, B. B.; ASIM, M.; SUH, Y.; YUN, J.; SETALURI, V.; MUKHART, H. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and in vivo by inducing apoptosis. **Clinic Cancer Research**, v14. n.7, 2008.

SALEM, M. Lupeol, a novel-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, p.109-115, 2009

SIDDQUI, I. A.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; IMTIAZ, H. M. Prevention of prostate cancer through custom tailoring of chemopreventive regimen. **Chemico-Biological Interactions**. v. 171, n.2, p.122-132, 2008.