

Efeito Citotóxico do *Andrographis paniculata* Associado ao 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) em células de câncer de mama triplo negativo e melanoma.

Laiso AR; Machado LJA; Rabelo DC; Maria DA.

Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Industrial. Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

CNPq: 150190/2017-4 437845/2016

Introdução

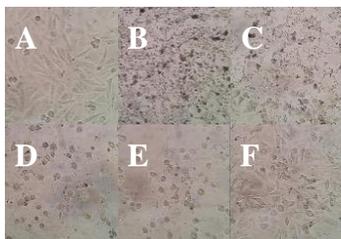
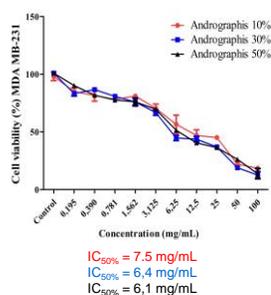
O (2-AEH₂F) é um precursor na biossíntese de fosfolípidios, capaz de reduzir significativamente a expressão de moléculas pró-apoptóticas o que leva ao aumento da atividade da caspase-3, desencadeando a apoptose e bloqueando o ciclo celular na fase de síntese ou na fase G2/M nas células tumorais. *Andrographis paniculata* é um bioativo natural da família Acanthaceae que promove inibição da via MAPK / ERK e, por consequência, dos mediadores inflamatórios de doenças auto-imunes, prostaglandinas e interleucinas. Nosso grupo de pesquisa já tem caracterizado os ensaios com o (2-AEH₂F) em diversas células tumorais e nem associação visa avaliar os efeitos sinérgicos.

Casuística e Métodos

O desenvolvimento do presente trabalho foi elaborado com células humanas tumorais e mantidas em cultura para avaliação da atividade antiproliferativa e de citotoxicidade in vitro. Foram utilizadas as linhagens humanas tumorais de mama triplo negativo MDA MB -231, Melanoma (B16F10) cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 suplementada com 10% de soro fetal bovino e antibióticos, à 37°C e 5% de CO₂. O composto O (2-AEH₂F) foi obtido por esterificação, analisados por HPLC MS/MS, diluídos em água mQ. Os experimentos de verificação da viabilidade celular, obtenção dos valores de IC₅₀ foi utilizado o teste colorimétrico do MTT e as modificações da distribuição da população celular nas fases do ciclo celular, potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo. Análises das alterações morfológicas foram realizadas por microscopia de campo claro.

Resultados

Ensaio de viabilidade celular em células tumorais de mama humana MDA MB-231

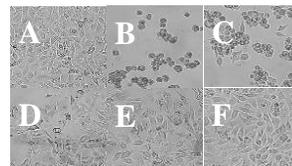
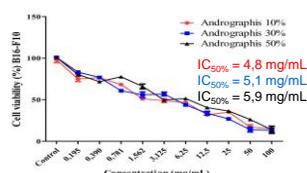


Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais de câncer de mama triplo-negativas humanas MDA MB-231. As células foram tratadas com diferentes concentrações do *A. paniculata* após 24h. (a) Controle; (b) 100mg/mL (c) 50mg/mL (d) 25mg/mL (e) 12,5mg/mL (f) 3,125mg/mL.

Determinação da citotoxicidade nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativas humanas MDA MB-231 pelo método colorimétrico MTT.

Resultados

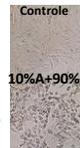
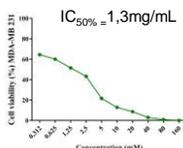
Ensaio de viabilidade celular em linhagens tumorais de melanoma B16F10.



Determinação da citotoxicidade nas células tumorais de melanoma B16-F10 pelo método colorimétrico MTT. Gráfico de barras mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes do tratamento com *A. paniculata* após 24h.

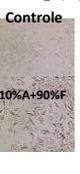
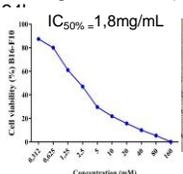
Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais melanoma murino B16-F10. As células foram tratadas com diferentes concentrações do *A. paniculata* após 24h. (a) Controle; (b) 100mg/mL (c) 50mg/mL (d) 25mg/mL (e) 12,5mg/mL, (f) 3,125mg/mL.

Ensaio de viabilidade celular após o tratamento da associação do (2-AEH₂F) com *A. paniculata*



Determinação da citotoxicidade nas células tumorais de câncer de mama triplo-negativas humanas MDA MB-231 pelo método colorimétrico MTT. Gráfico de barras mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes do tratamento com *A. paniculata* associado ao 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) após 24h.

Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais de câncer de mama triplo-negativas humanas MDA MB-231. As células foram tratadas com diferentes concentrações do *A. paniculata* associado ao 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) após 24h. (a) Controle; (b) 3mg/mL (c) 1,5mg/mL (d) 0,75mg/mL, (e) 0,37mg/mL (f) 0,18mg/mL



Determinação da citotoxicidade nas células tumorais de melanoma B16-F10 pelo método colorimétrico MTT. Gráfico de barras mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média±DP de três experiências independentes do tratamento com *A. paniculata* associado ao 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) após 24h.

Fotomicrografias da análise morfológica das células tumorais de câncer de mama triplo-negativas humanas MDA MB-231. As células foram tratadas com diferentes concentrações do *A. paniculata* associado ao 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) após 24h. (a) Controle; (b) 3mg/mL (c) 1,5mg/mL (d) 0,75mg/mL (e) 0,37mg/mL (f) 0,18mg/mL.

Conclusões

Nos estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com o precursor fosfolípido 2-aminoetil dihidrogeno fosfato (2-AEH₂F) em tratamentos por 24 horas com as células tumorais humanas de mama triplo negativo MDA MB-231 e melanoma B16F10 foram obtidos os valores de IC₅₀ de 20,4 mM e 89,7 mM. Neste trabalho avaliou-se a atividade isolada do composto natural *Andrographis* e com a sua associação ao (2-AEH₂F) conseguiu-se valores de IC₅₀ significativos em menores concentrações que nos incentiva a aprofundar os estudos sobre o seu potencial farmacológico.

No tratamento do composto *Andrographis* na maior concentração em células tumorais de mama MDA MB-231 por 24 horas verificou-se uma IC₅₀ de 6,1 mg/ml e nas células de melanoma humano B16F10 apresentou uma IC₅₀ 5,9 mg/ml. Nas associações dos compostos os valores de IC₅₀ obtidos foram 1,3mg/ml e 1,8mg/ml respectivamente. Isso demonstra que o tratamento apresentou um efeito significativo, pois o valor da concentração do composto *Andrographis*, foi reduzido. Nas células normais humanas (fibroblasto FN-1), o tratamento não apresentou citotoxicidade, nas mesmas condições experimentais. Os resultados encontrados neste estudo corroboram para futuras aplicações, uma vez que tivemos valores de IC₅₀ significativos e seletividade para células tumorais, quando comparadas ao tratamento com células normais.

Contato

Durvanei Augusto Maria : durvanei@usp.br

Rosa Andrea Laiso Machado : professorarosa2012@gmail.com

Alvaro Jorge Laiso Machado : alvaro.machado@esib.butantan.gov.br

Daniel Rabelo : Daniel.rabelo@butantan.gov.br