

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS EXTRATOS DE *Tethya rubra*, *Tethya ignis* E *Mycale angulosa* EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA.

Karina Miyuki Retamiro (PIC/UEM), Vanessa Kaplum (Doutorado/UEM),
Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: cvnakamura@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde/Maringá, PR.

Ciências da Saúde – Farmácia.

Palavras-chave: Adenocarcinoma prostático, esponjas marinhas, atividade antitumoral.

Resumo

O adenocarcinoma prostático é considerado uma das patologias mais incidentes entre os homens e a segunda mais frequente no Brasil. O tratamento pode ser ineficaz no caso de neoplasia hormônio-resistente, de modo que se faz necessário a busca por novos compostos com ação antitumoral. O trabalho tem como objetivo, determinar a atividade dos extratos de *Tethya rubra*, *Tethya ignis* e *Mycale angulosa* frente as células de adenocarcinoma de próstata (PC3) por diferentes metodologias e avaliar a capacidade de migração celular. Para isso, foram utilizadas as metodologias para determinar a viabilidade celular (MTT e LDH), além do ensaio de cicatrização. O extrato de *T. ignis* apresentou melhor atividade antitumoral comparado aos outros extratos, com um IC₅₀ de 50,29 µg/mL para a metodologia de MTT e 159,60 µg/mL para LDH, porém, para o método de cicatrização celular, o extrato de *T. rubra* teve melhor desempenho, mostrando que os extratos possuem mecanismos de ação diferentes. Logo, os extratos de *T. ignis*, *T. rubra* e *M. angulosa* apresentaram atividade citotóxica promissora, avaliados por metodologias diferentes, em células PC-3, além de inibir a migração celular, comprovando a ação antitumoral das esponjas marinhas avaliadas.

Introdução

O câncer de próstata é uma neoplasia maligna influenciada por diversos fatores de risco como a raça, genética e a idade, caracterizada pela proliferação exacerbada e pela alteração das células normais (INCa, 2011). Segundo a OMS, o adenocarcinoma prostático é o segundo mais incidente nos homens, e o primeiro mais frequente no Brasil, tornando-o um problema de saúde pública. O tratamento pode ser realizado pela remoção do tumor, também chamado de prostatectomia, além da quimio e radioterapia. Para casos metastáticos é feito um tratamento hormonal, porém as células neoplásicas podem ser hormônio-resistentes, conferindo maior dificuldade

no tratamento. Logo, a busca por um novo composto eficaz, torna-se de grande importância.

Estudos relatam que as esponjas marinhas possuem atividade biológica devido aos diversos metabólitos produzidos, dentre elas a atividade antitumoral, que foi comprovada pelo uso do análogo do nucleosídeo de *Tethya crypta*, o Ara-C, utilizado atualmente no tratamento de leucemias (Frota et al., 2012). Desse modo, o objetivo do trabalho é determinar a citotoxicidade dos extratos de *Tethya rubra*, *Tethya ignis* e *Mycale angulosa* presentes na costa Brasileira, frente a célula PC3 por diferentes metodologias, além de avaliar a capacidade de migração das células por meio do ensaio de cicatrização.

Materiais e métodos

Cultura de células

Foram utilizadas as células de adenocarcinoma de próstata (PC-3). O meio de cultivo utilizado foi o Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino; as células foram mantidas a 37°C e tensão de 5% de CO₂.

Avaliação de citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT

A avaliação da atividade antitumoral dos extratos de *T. rubra*, *T. ignis* e *M. angulosa* foi realizada em células PC-3. Para isso, as células foram ressuspensas à concentração de $2,5 \times 10^5$ cels/mL em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, adicionado 100 µL nos poços da placa de 96 poços, e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Os extratos testados foram diluídos (5, 50, 100 e 200 µg/mL), adicionados sobre a monocamada celular e incubados por 48 h, nas mesmas condições. Após a incubação, os poços foram lavados com 100 µL de PBS, e adicionados 50 µL de solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) à 2 mg/mL. A placa foi incubada por 4 h a 37°C com 5% de CO₂ (protegido da luz) e foram adicionados 150 µL de DMSO. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS) a 570 nm e a concentração citotóxica para 50% das células (IC₅₀) foi determinada como a concentração capaz de reduzir 50% da densidade óptica das células tratadas em comparação com o controle. A análise foi feita por meio de regressão linear.

Determinação da citotoxicidade pelo kit LDH

Células PC3 foram ressuspensas à concentração de $2,5 \times 10^5$ cels/mL em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, adicionado 100 µL nos poços da placa de 96 poços, e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados os extratos de *T. rubra*, *T. ignis* e *M. angulosa* nas concentrações de 5, 50, 100 e 200 µg/mL, incubados por 48 h nas mesmas condições. Após, removeu-se 50 µL do sobrenadante e foi

transferido para uma nova microplaca e adicionado 50 µL do substrato do kit LDH (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit; Thermo Scientific®) em cada poço. A placa foi incubada por 30 min e a leitura foi realizada em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS) a 490 nm. A concentração citotóxica para 50% das células foi determinada como a concentração capaz de reduzir 50% da densidade óptica das células tratadas em comparação com o controle, pela avaliação de enzimas citosólicas após dano da membrana plasmática. A análise foi realizada por meio de regressão linear.

Ensaio de cicatrização

Para o ensaio de cicatrização, células PC3, foram cultivadas em placas de 24 poços a $2,5 \times 10^5$ cels/mL até alcançar confluência. As monocamadas foram feridas em uma linha reta com ponteira de 200 µL. As monocamadas feridas foram lavadas duas vezes com tampão PBS para remoção dos detritos celulares. O meio de cultura com ou sem os extratos de *T. rubra*, *T. ignis* e *M. angulosa* nas concentrações referentes ao IC₅₀ e 2x IC₅₀ foram adicionados aos poços do controle e do tratamento. A área da ferida foi analisada após 24 h a 37°C e 5% de CO₂, utilizando um microscópio invertido. A velocidade de cicatrização de feridas foi calculada como o percentual da ferida inicial até o fechamento total da ferida nos diferentes pontos de tempo usando o software livre Image J (Moroz et al., 2013).

Resultados e Discussão

Para a avaliação da citotoxicidade pelo método de MTT, o extrato bruto de *Tethya ignis* apresentou uma atividade promissora em relação aos outros extratos (Tabela 1), visto que na concentração de 50,29 µg/mL foi capaz de reduzir 50% da densidade óptica em relação ao controle, indicando que o extrato pode atuar na mitocôndria celular. Para a avaliação da enzima lactato desidrogenase, o extrato não demonstrou uma atividade significativa, supondo que o extrato causa poucos danos na membrana celular, demonstrado pelos elevados valores de IC₅₀ avaliado.

Tabela 1- Avaliação da atividade antitumoral dos extratos de *T. rubra*, *T. ignis* e *M. angulosa* pelos métodos colorimétricos de MTT e LDH.

Extratos	IC ₅₀ (µg/mL)	
	MTT	LDH
<i>Tethya ignis</i>	50,29	159,64
<i>Tethya rubra</i>	80,59	>200
<i>Mycale angulosa</i>	60,64	>200

Já para o ensaio de cicatrização, observamos que todos os extratos suprimiram a taxa de migração celular após 24 h de tratamento quando comparado com o controle (Figura1). Para o IC₅₀, a esponja *T. ignis* inibiu 13,33%, seguido de *T. rubra* com 27,33% e *M. angulosa* com 21,20% e, para a concentração de 2xIC₅₀, os extratos inibiram 35,19, 53,98 e 37,92%,

respectivamente. Logo, o extrato de *T. rubra* teve melhor desempenho para o ensaio de cicatrização, porém apresentou um IC₅₀ maior quando comparado com *T. ignis* e *M. angulosa*, indicando que possuem mecanismos de ação divergentes.

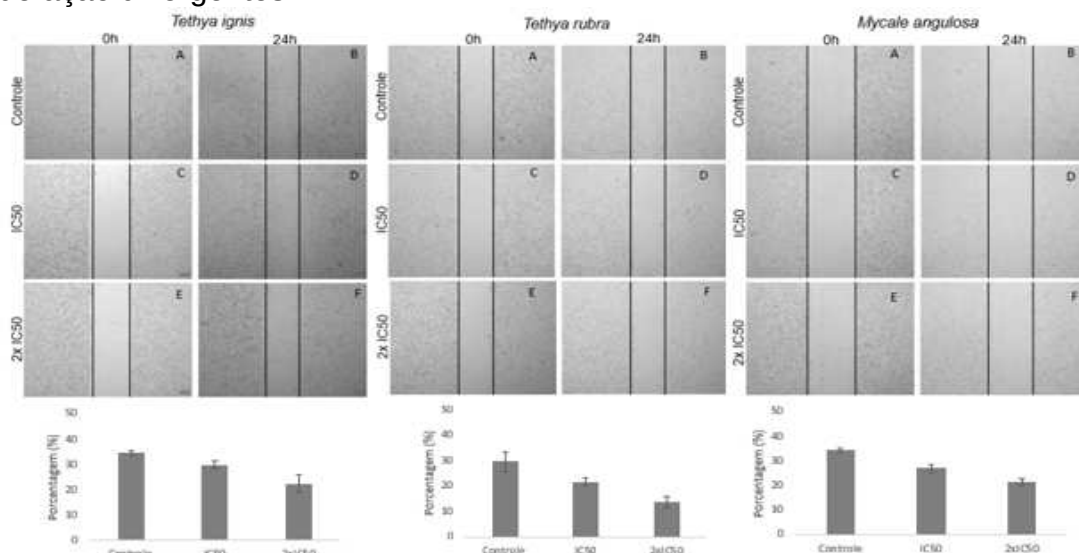


Figura 1- Ensaio de cicatrização com células PC3 após 24 h de tratamento frente aos extratos de *Tethya ignis*, *Tethya rubra* e *Mycale angulosa*.

Conclusões

Os extratos de *T. ignis*, *T. rubra* e *M. angulosa* apresentaram atividade citotóxica promissora, avaliados por metodologias diferentes, em células de adenocarcinoma de próstata, além da capacidade de inibir a migração celular, comprovando a ação antitumoral das esponjas marinhas avaliadas.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio e Bolsa de iniciação científica.

Referências

ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 2011.

Frota MJ, Silva RB, Mothes B, Henriques AT, Moreira JC. Current status on natural products with antitumor activity from Brazilian marine sponges. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012, 235-44. [Pubmed: 21466432]

Moroz A, Delella FK, Almeida R, Lacorte LM, Fávaro WJ, et al. (2013) Finasteride Inhibits Human Prostate Cancer Cell Invasion through MMP2 and MMP9 downregulation. *PLOS ONE* 8(12): e84757, doi: 10.1371/journal.pone.0084757.