

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA
CASCA DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM CÉLULAS DE
OSTEOSSARCOMA CANINO IN VITRO**

Karla Márcia da Silva Braga
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA
2016



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1 **1. Identificação do material bibliográfico:** ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

1 **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

2

Nome completo do autor: Karla Márcia da Silva Braga

Título do trabalho: **ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA CANINO IN VITRO**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Karla Márcia da Silva Braga
Assinatura do (a) autor (a)²

Data: 16 / 12 / 2016.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

² A assinatura deve ser escaneada.

KARLA MÁRCIA DA SILVA BRAGA

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA
CASCA DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM CÉLULAS DE
OSTEOSSARCOMA CANINO IN VITRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciência Animal junto ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola
de Veterinária e Zootecnia da Universidade
Federal de Goiás

Área de concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo – EVZ/UFG

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Cesário Bianchi Filho – Universidade Brown

Prof. Dr. Kleber Fernando Pereira – CAJ/UFG

GOIÂNIA

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Braga, Karla Márcia da Silva
ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA
DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM CÉLULAS DE
OSTEOSSARCOMA CANINO IN VITRO [manuscrito] / Karla Márcia
da Silva Braga. - 2016.
xlvii, 46 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Eugênio Gonçalves de Araújo; co
orientador Dr. Prof. Cesário Bianchi Filho; co-orientador Dr. Prof.
Kleber Fernando Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Cultivo celular. 2. IC50. 3. Plantas do cerrado. 4. Tanino. 5.
Viabilidade Celular. I. Araújo, Prof. Eugênio Gonçalves de , orient. II.
Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



1 ATA NÚMERO **443** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às **14h30min** do dia **04/03/2016**, reuniu-se na sala
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo
6 (a) Pós-Graduando (a) **Karla Márcia da Silva Braga**, intitulada: "*Atividade citotóxica do extrato*
7 *etanólico da casca do pequi (Caryocar brasiliense) em células de osteossarcoma canino in vitro*",
8 apresentado para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração:
9 **Patologia, Clínica e Cirurgia Animal**, desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora,
10 **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a)
11 candidato (a) **Karla Márcia da Silva Braga** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho.
12 A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores,
13 os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos,
14 assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a
15 arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu
16 Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

17 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo (Orientador (a))

Aprovada

18 Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno

Aprovada

19 Profa. Dra. Yandra Cássia Lobato do Prado

APROVADA

20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Karla Márcia da**
21 **Silva Braga**, habilitada [(Habilitado(a) ou não Habilitado(a)) pelo(s)
22 motivo(s) abaixo exposto(s):

23 a candidata cumpriu os requisitos necessários
24 para obter seu título de mestre, tendo apresenta-
25 do e defendido seu trabalho perante a banca
26 examinadora de acordo com os padrões exigidos.

27 _____
28 _____
29 _____
30 _____
31 _____
32 _____
33 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



34 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

35 _____
36 _____
37 _____
38 _____
39 _____
40 _____

41 Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo** lavrei a presente ata que,
42 após lida e achada conforme foi por todos assinada.

43 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

44 Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno

45 Profa. Dra. Yandra Cássia Lobato do Prado

Eugênio Gonçalves de Araújo
Adilson Donizeti Damasceno
Yandra Cássia Lobato do Prado

DEDICATÓRIA

Dedico este mestrado ao meu esposo Fernando, aos meus filhos Fernando Júnior, Matheus e Ana Carolina, aos meus pais José e Vanda pelo amor, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida, direcionamento e proteção.

Ao meu esposo Fernando Rodrigues Braga, por estar ao meu lado com amor, sempre disposto a me ajudar. Pelo incentivo e apoio aos meus estudos quando decidi ingressar no mestrado.

Aos meus filhos Fernando Rodrigues Braga Júnior, Matheus Rodrigues Braga e Ana Carolina Rodrigues Braga, pelo amor incondicional. Por cada sorriso ao me verem retornar para casa entre inúmeras idas e vindas.

Aos meus amados pais José Pereira da Silva e Vanda Maria da Silva (*in memoriam*), por serem meus exemplos de vida, persistência, dignidade, amor e fé.

Ao meu irmão Gilvan César da Silva, pelo companheirismo, amizade, alegria constante que me animava nas horas difíceis.

À minha sogra Marlene Rodrigues Braga por ser a segunda mãe de meus filhos, pelo amor dedicado a eles em minhas ausências.

À Maria José Batista dos Santos por me auxiliar nos cuidados com as crianças com infinito amor e dedicação.

Aos meus pais de coração e tios Joaquim Pereira da Silva e Marinete de Fátima Santos da Silva pelo amor e orações.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, por ter me aceitado como orientanda. Mestre que com sua sabedoria ímpar, paciência, carinho, me conduziu ao universo da pesquisa científica, com inestimáveis contribuições tanto para meu crescimento profissional quanto pessoal.

À Dr.^a Vanessa de Sousa Cruz, amiga, anjo de asas na Terra que me acolheu em todos os momentos com sabedoria, ensinamentos e auxílios imprescindíveis para a execução deste.

Ao Comitê de orientação, composto pelos professores Dr. Cesário Bianchi Filho e Prof. Dr. Kleber Fernando Pereira, pelas co-orientações.

Ao professor Dr. Adilson Donizeti Damasceno e Dr.^a Yandra Cássia Lobato do Prado por aceitarem ao convite de participação na banca de defesa desta dissertação, com valorosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Aos professores que ministraram as disciplinas que cursei durante o mestrado, o conhecimento adquirido nas aulas, discussões e seminários contribuíram significativamente para a minha formação profissional.

Aos colegas do Laboratório Multiusuário de Cultivo Celular da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, pelas colaborações.

Aos graduandos e estagiários João Felipe Freire Oliveira e Luiza Toffano Seidel Calazans, Thaís Poltronieri dos Santos por estarem sempre presentes, sem medirem esforços.

À Mestre e amiga Paula Costa Ariza, pelas contribuições e palavras de incentivos que me motivaram perante as dificuldades.

Aos irmãos de coração, Rubia E. Chies, Alexandre Chies e Jasielia de Sousa pela amizade infinita e por acreditarem que eu seria capaz.

À Universidade Federal de Goiás, à Escola de Veterinária e Zootecnia, ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, ao Laboratório Multiusuário de Cultivo Celular, que se tornaram minha segunda residência no decorrer dos últimos anos, capacitando-me e conferindo o conhecimento necessário para a tão almejada pós-graduação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de auxílio à pesquisa do meu mestrado, que permitiu a minha dedicação exclusiva a este estudo.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento), pelo financiamento concedido para a realização desta pesquisa.

E a todos que de alguma forma me auxiliaram e colaboram para a minha formação.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

“São precisamente as perguntas para as quais não existem respostas que marcam os limites das possibilidades humanas e traçam as fronteiras da nossa existência.”

Milan Kundera

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Tecido ósseo	2
2.2. Osteossarcoma	2
2.2.1. Etiopatogenia	4
2.2.2. Aspectos clínicos e diagnósticos	5
2.2.3. Novas perspectivas de tratamento do osteossarcoma com substâncias fitoterápicas	7
2.3. Bioma Cerrado	10
2.3.1. Fruto do Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>)	11
2.4. Cultura de células e citotoxicidade	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Local de realização do experimento	18
3.1.1. Células e cultivo celular	18
3.1.2. Obtenção do extrato etanólico da casca do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>)	18
3.1.3. Delineamento Experimental	19
3.1.4. Análise de Viabilidade Celular	20
a) Método de Exclusão de Azul de Tripan	20
b) Método de redução do tetrazólio (MTT) para análise da viabilidade celular	21
3.1.5. Ensaio de sobrevivência celular	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Pequi (Caryocar brasiliense camb) nativo em vegetação típica do bioma Cerrado. 12
- FIGURA 2 - Aspectos morfológicos do pequi (Caryocar brasiliense). A. Seta dupla, representa o exocarpo (casca) do fruto globoso, de coloração esverdeada. Seta simples, é o mesocarpo externo ou polpa branca. B. Cabeça de seta, mesocarpo interno constituído da porção comestível do fruto do pequi, de coloração alaranjado intenso. Seta simples é o endocarpo espinhoso com inúmeros espinhos entremeados. Seta curva, identifica a semente na parte interna do fruto..... 13

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Propriedades físicas do pequi	14
TABELA 2 - Propriedades químicas do pequi.....	15
TABELA 3 – Ensaio de viabilidade celular pelo método de Azul de Tripan em células de osteossarcoma tratadas com extrato etanólico da casca do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>). Os resultados são expressos em percentagem média relativa ao grupo sem tratamento (controle negativo). Letras diferentes em uma mesma linha expressam resultados significativamente diferentes (Teste F, $p < 0,05$). Símbolos diferentes em uma mesma linha expressam resultados significativamente diferentes (Teste F, $p < 0,05$).....	23
TABELA 4 - Valores das concentrações que inibem 50% da viabilidade celular (IC_{50}), expressas em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ com seu desvio padrão, e valores convertidos para unidades-padrão internacionais ($\mu\text{g}/\text{mL}$), de acordo com os diferentes tempos de tratamento com o extrato etanólico da casca do pequi (EECP).....	25

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Características comparativas entre osteossarcoma canino e humano.....	4
QUADRO 2 - Parâmetros físico-químicos analisados do extrato etanólico da casca de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>). GAE – equivalente em ácido gálico.....	19
QUADRO 3 – Concentrações e tempo de exposição das células de osteossarcoma ao extrato etanólico da casca de pequi.	20

RESUMO

O osteossarcoma é uma neoplasia de origem mesenquimal de elevada mortalidade em cães e no homem. Ensaios de citotoxicidade com plantas tropicais têm sido realizados para identificar possíveis princípios ativos medicinais capazes de inibir a proliferação de células tumorais. O cerrado é a vegetação predominante da região Centro-Oeste do Brasil, rico em biodiversidade, no qual frutos, como o pequi (*Caryocar brasiliense*) são amplamente conhecidos, porém pouco explorados quanto a suas propriedades farmacológicas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi verificar a atividade citotóxica do extrato etanólico da casca de pequi em células de osteossarcoma canino em cultura estabelecida, obtidas do banco de linhagens celulares, subcultivadas e submetidas ao tratamento com o EECP em três diferentes concentrações e três diferentes tempos de exposição. O tratamento que inibiu de forma mais eficiente o crescimento celular foi o grupo no qual foram adicionados 10µl do EECP por 72 horas, resultando em crescimento de 28,20% em relação ao controle, ou seja, uma inibição de 71,80%. A menor média do IC₅₀ foi de 155,2 µg/mL, no tratamento que recebeu 10µl do EECP por 72 horas. Com o cálculo das frações de sobrevivência presumiu-se que o crescimento celular, após o tratamento, foi menor (3,33 %) no grupo tratado por 72 horas com a concentração de 10 µl. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que o extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) possui efeito citotóxico sobre as células de osteossarcoma canino, promovendo redução da viabilidade celular de forma dependente do tempo de exposição e da concentração do extrato utilizada.

Palavras-chave: Cultivo celular, IC₅₀, plantas do cerrado, tanino, viabilidade celular.

ABSTRACT

Osteosarcoma is a mesenchymal high mortality tumor of dogs and men. Cytotoxicity assays employing tropical plants have been performed in order to identify possible active compounds able to inhibit neoplastic cells proliferation. The fruits from the Cerrado, Center-west Brazil's diversity-rich, predominant vegetation, are well-known by the general public but very little is known about their pharmacological properties. Thus, the aim of this study was to verify the cytotoxic activity of the ethanoic extract of the pequi fruit mesocarp (EECP) on established-cultured osteosarcoma cells that were obtained from a cell line bank, sub-cultured and subjected to treatment with EECP in three different concentrations for three different periods of time. The most efficient treatment to inhibit cell growth was the 10 μ l, 72 hour-group, which resulted in a 28,20% growth rate as compared to controls, i.e., a 71,80% inhibition. The smallest IC₅₀ average was 155,2 μ g/mL, also in the 10 μ l, 72 hour-group. As the survival rate was calculated, it was presumed that, following treatment, growth was smaller in the 10 μ l, 72 hour-group. The ethanoic extract of the pequi fruit mesocarp has a cytotoxic effect on canine osteosarcoma cells, reducing cell viability in both exposing time and concentration-dependent manner of the extract used.

Keywords: Cell culture, cerrado plants, cell viability. IC₅₀, tannin

1. INTRODUÇÃO

O osteossarcoma canino é um tumor ósseo primário potencialmente maligno e agressivo com características similares em humanos e cães, que na progressão da doença resulta em metástase pulmonar. A alta prevalência da doença é correlacionada à capacidade metastática, que culmina em óbito em até 80% dos animais. São frequentes os casos de osteossarcoma caninos na rotina da clínica de pequenos animais, no qual mediante a sua importância e, por serem altamente comparativas em ambas as espécies incitam a constantes pesquisas que proporcionem melhor discernimento a respeito desta neoplasia em humanos.

Múltiplos estudos somam esforços na sociedade científica a fim de identificarem em plantas e frutos, substâncias bioativas e medicinais com possíveis potencialidades inibitórias, que possam ter ação contra células neoplásicas. Estudos *in vitro* com linhagens celulares tumorais são instigados ao reconhecimento de componentes bioativos existentes em plantas, que proporcione melhor discernimento sobre o mecanismo de ação em células neoplásicas.

Com seu peculiar clima e vegetação, o cerrado brasileiro também é uma fonte imensurável de biomoléculas. De forma análoga ao descrito em plantas encontradas em outros tipos de vegetação, o conhecimento do potencial antitumoral das plantas do cerrado, particularmente de sua planta-símbolo, o pequi, pode revelar novas alternativas na terapia antitumoral que minimizem os efeitos colaterais dos tratamentos antineoplásicos convencionais, que ofereçam melhores condições de tratamento e bem estar do homem e do animal.

São imprescindíveis os ensaios que possam avaliar a eficiência de metabólitos secundários presentes no fruto do pequi em linhagens carcinogênicas para verificar seu potencial preventivo, terapêutico ou até mesmo curador de neoplasias, como o osteossarcoma. O que ressalta a importância desse tipo de estudo.

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade citotóxica do extrato etanólico da casca de pequi em células de osteossarcoma canino em cultura estabelecida, obtidas do banco de linhagens celulares, subcultivadas e submetidas ao tratamento com o EECF em três diferentes concentrações (0,1µl, 1,0µl, 10µl) e em três diferentes tempos de exposição (24h, 48h e 72h) para análise de viabilidade celular pelos métodos de exclusão do Azul de Tripán; Redução de Tetrazólio e Ensaio de Sobrevivência Celular, realizados em três experimentos independentes, em triplicata.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tecido ósseo

O sistema esquelético compreende ossos, articulações e estruturas de sustentação que amparam e protegem o organismo, além de promover a movimentação. É classificado como esqueleto axial que compreende a cabeça, as vértebras, costela e o esterno e em apendicular formado pelos membros torácicos e pélvicos. O osso é um tecido de sustentação amplamente especializado e dinâmico que exerce funções de apoio mecânico, proteção e locomoção. Em condições normais, o tecido ósseo é exposto a diversos fatores mecânicos, físicos, químicos e hormonais que influenciam diretamente nos mecanismos de síntese, destruição e regeneração, o que justifica a constante remodelação desse importante tecido¹.

O osso é constituído por diferentes populações celulares que resguardam a integridade óssea, como células de sustentação (osteoblastos e osteócitos), osteoide que compõe matriz desmineralizada de colágeno e glicosaminoglicanas, os osteoclastos, células oriundas de células-tronco hematopoiéticas envolvidas no processo de reabsorção óssea, por células tronco mesenquimais, células endoteliais, condrócitos, e sais inorgânicos que são depositados na matriz do osso. Uma fina camada de tecido conjuntivo recobre osso internamente (endóstio) e externamente (perióstio) que responde pela nutrição e fornecimento de células osteoblásticas responsáveis pela síntese ou reparação óssea².

A formação e a remodelação óssea são condizentes ao equilíbrio existente entre interações celulares, em um processo de compensação que atua no controle da síntese de atividades biológicas de elementos que compõem a matriz extracelular. Desse modo, promovem a manutenção da homeostase óssea em relação à proliferação celular, diferenciação e apoptose. Por outro lado, sarcomas ósseos surgem devido à alta instabilidade genética que resulta em mutações em linhagens de células mesenquimais, nas quais células neoplásicas se manifestam espontaneamente por meio de síntese de matriz óssea em outro tecido³.

2.2. Osteossarcoma

O osteossarcoma (OS) é uma neoplasia de células mesenquimais, primária, heterogênea, intraóssea maligna, com características histológicas diversificadas. O processo etiológico da doença é de curso desconhecido, todavia diversas suposições são

discutidas sobre a origem do tumor ósseo. Em humanos, o OS é apontado como o principal tumor ósseo maligno com desenvolvimento em crianças e adultos jovens, entre 10 a 20 anos de idade (20%) e corresponde a 5% de todos os tumores pediátricos. Em animais domésticos, o OS é um tumor que se manifesta frequentemente na espécie canina (80%), e com menor incidência os felinos (50%), sendo raro em outras espécies. Os cães que desenvolvem a doença apresentam acentuada expressão de interleucina 8 e SLC1A3, comportamento biológico que pode ser observado em humanos associado a um pior prognóstico e que sugere semelhança no mecanismo do desenvolvimento da neoplasia nas duas espécies^{4,5,6,7,8}.

A malignidade deste tumor potencialmente agressivo é responsável por aproximadamente 90% dos tumores ósseos primários no cão. O OS canino é caracterizado por ser intensamente infiltrativo, altamente metastático com formação de osteoide, osso ou ambos em tecidos distantes da origem primária. A alta prevalência deste tumor é correlacionada à capacidade metastática, principalmente nos pulmões por via hematogêna, o que pode ser responsável pelo óbito em até 80% dos animais. A redução da variabilidade genética nos cães, estimulado pela criação indiscriminada de novas raças, que advêm com mutações genômicas, entre outros fatores, têm sido considerada como uma relevante condição que predispõe os cães ao desenvolvimento do OS^{9,10,11,12}.

Por ser um tumor ósseo primário comum em humanos e cães, regiões metafisárias de ossos longos e tubulares como úmero, rádio, ulna, fêmur e tíbia são os mais agredidos. Em humanos, o tumor geralmente acomete adolescentes em fase de puberdade, cujo pico de desenvolvimento da doença advém do rápido crescimento das placas ósseas, enquanto que em cães predominam os de raças grandes e adultos após o encerramento tardio das placas de crescimento, o que denota uma marcante diferença entre as espécies. Devido às similaridades fenotípicas, histológicas, conduta biológica, bem como alterações genéticas e moleculares entre as espécies, o cão constitui um modelo auxiliar para o desenvolvimento e ensaios pré-clínicos para novas terapias para o OS humano^{13,14,15}.

O osteossarcoma primário se desenvolve com frequência em cães, sendo que fatores como raça, sexo, peso e idade, predispõem estes animais à evolução da doença. É equivalente a 80-85% das neoplasias ósseas e representa de 5-6% entre todos os tumores diagnosticados. A idade do animal é variável, pode ocorrer em animais muito jovens entre um e dois anos de idade, embora a idade média seja superior a sete

anos. Cães machos acima de 40 kg são mais acometidos que as fêmeas, raças de grande porte ou gigante são as mais vulneráveis, tais como: Rottweiler, São Bernardo, Boxer, Doberman Pinscher, Greyhounds. No Brasil, é grande o desenvolvimento da doença em cães da raça Fila Brasileiro^{8,9,11,15,16}.

Assim como na espécie animal, no OS, os homens são mais acometidos que as mulheres, possivelmente há uma relação entre o desenvolvimento acelerado dos ossos com a formação da neoplasia óssea. Assim o modelo canino, devido à similaridade entre as espécies é um dos modelos de investigação mais favorável e utilizado em pesquisas para compreensão do desenvolvimento neoplásico em humanos (Quadro 1)^{5,17,18,19}.

QUADRO 1 – Características comparativas entre osteossarcoma canino e humano

VARIÁVEL	CÃO	HUMANO
Idade	7 anos	14 anos
Raça	Raças puras grandes e gigantes	Não aplicável
Peso	90% > 20 kg	Pesado
Local	77% metástase ossos longos radio distal > úmero proximal > fêmur distal > tibia	90% metástase ossos longos fêmur distal > tibia proximal > úmero proximal
Etiologia	Geralmente desconhecida	Geralmente desconhecida
% clinicamente confinados ao membro na apresentação	80-90%	80-90%
% alterações histológicas de alto grau	95%	85-90%
Índice de DNA	75% aneuploidia	75% aneuploidia
Indicadores de Prognóstico	Jovem, com aumento de fosfatase alcalina	Aumento de fosfatase alcalina MDR1
Taxa de metástase sem quimioterapia	90% antes de 1 ano	80% antes de 2 anos
Local de implantação de metástase	Pulmões > osso > tecidos moles	Pulmões > osso > tecidos moles
Melhora da sobrevida com quimioterapia	Sim	Sim
Tratamento Quimioterápico	4-6 ciclos	➤ 1 ano
Metástase de linfonodos regional	Prognóstico ruim, <5%	Prognóstico ruim
Reparo cirúrgico	Frequente com artrodese	Prótese

Fonte: Adaptado de Withrow & Wilkins⁴

2.2.1. Etiopatogenia

Malignidades ósseas como OS em cães geralmente ocorrem em microambiente alterado, onde que células passam a se proliferar de modo incomum, com crescimento desordenado, rápido e autônomo. Ainda que o mecanismo da

carcinogênese seja uma incógnita, é certo que a linhagem celular osteogênica participa ativamente da iniciação e progressão da doença. Hipóteses são atribuídas às transformações celulares malignos, como a susceptibilidade celular em sítios de crescimento como na metáfise de ossos longos, que suportam grande parte do peso corporal; também é incriminado o encerramento tardio das placas de crescimento, devido à constante proliferação com íntima ligação a fatores mitogênicos. Mecanismos traumáticos por implantes ortopédicos, exposição à radiação ionizante, transformações genéticas e supostamente infecções virais contribuem para a neoformação. Raras são as ocorrências primárias em tecido extraesquelético (1%), como pênis, músculos das coxas e no retroperitônio, embora tenham sido citados em estudos anteriores. Contudo, metástases podem se expandir em outros tipos de tecido e órgãos tais como: fígado, baço, rim, íleo, vagina e testículo^{3,8,20,21}.

O potencial de disseminação por metástases e o aumento na mortalidade está diretamente ligado à localização do OS. Segundo Ettinger²², a neoplasia primária em cães se desenvolve com maior probabilidade nos membros torácicos que nos membros pélvicos, na relação de 2:1. Desse modo, neoplasias situadas na extremidade do rádio distal perfazem um menor risco a metástases. Por outro lado, aqueles localizados na proximal do úmero e tíbia, fêmur distal implicam em elevada capacidade metastática, com ampliação significativa da mortalidade^{23,24}.

OS se apresenta como uma neoplasia extremamente instável geneticamente, desse modo, as anomalias moleculares provocam alterações cromossômicas. Estas podem ser de ordem estrutural ou numérica. As mutações numéricas dos cromossomos são ocasionadas por falhas durante a fase de mitose que resultam em poliploidia, aneuploidia, supressões, duplicações, descontrolo nas translocações e mutações germinativas. As irregularidades acontecem normalmente pelo acréscimo de um cromossomo 1 ou perda de cromossomos 9,10,13 e 17, com danos parciais ou totais do cromossomo 6, e também anelamento de cromossomos. Nas mutações estruturais há a reestruturação dos cromossomos 11, 19 e 20, e ausência de características de translocações recíprocas^{25,26}.

2.2.2. Aspectos clínicos e diagnósticos

A principal manifestação clínica do osteossarcoma apendicular em cães é a presença de claudicação. Contudo, lesões axiais são identificadas pela dor à palpação e

progressivo aumento de volume. A dificuldade respiratória pode ser associada à metástase pulmonar. O diagnóstico dos sarcomas ósseos é fundamentado pelo curso clínico, por meio de exame físico, laboratorial e também radiográfico pela ocorrência de fraturas patológicas²⁰. A formação de uma massa neoplásica é facilmente distinguida pela observação do osso afetado em imagem radiográfica, tais como deformações ósseas provocadas por lesões destrutivas e infiltrativas. A neoplasia, ao longo de seu desenvolvimento, pode romper a cortical do osso, com proeminente elevação do periósteo com identificação peculiar do triângulo de Codman, o que é sugestivo de neoplasia óssea primária²⁷.

A radiografia simples, associada ao exame clínico, é considerada atualmente a ferramenta diagnóstica complementar mais adequada para o diagnóstico do OS canino. Além disso, a cintilografia óssea, quando disponível, deve ser utilizada para a detecção de metástases. A tomografia computadorizada e a ressonância magnética são exames menos utilizados, porém oferecem alta qualidade de imagem que possibilitam a observação de extensão e profundidade da lesão, o que favorece o diagnóstico²⁸.

No diagnóstico por imagem radiográfica, OS são descritos como líticos, escleróticos ou mistos. Em conformidade ao sítio de origem tumoral, a neoplasia é relatada como central, justacortical ou periostial; além desses, existe a forma incomum conhecida como OS telangiectásico, que macroscopicamente é similar ao hemangiossarcoma²⁹.

Na avaliação macroscópica são observadas massas neoplásicas grandes, destrutivas, com aspecto amarelo-esbranquiçado, ou branco-acinzentado, a superfície pode ser lobulada e irregular, ou mesmo rugosa, além disso, a massa pode ser sanguinolenta e cística^{27,29}.

O exame histopatológico é considerado padrão ouro para o diagnóstico definitivo de OS, diferentemente do exame citológico, que pode ser inconclusivo. A classificação histológica de OS é realizada a partir em fragmentos de biópsias, a qual requer cuidadosa classificação, devido à sua intensa heterogeneidade. Em cães, OS são classificados como simples, compostos e pleomórficos; simples, quando há síntese óssea em matriz colagenosa; o tipo composto é caracterizado pela presença de osso e cartilagem; os pleomórficos, por sua vez, cursam com formação de ilhotas de osteoide e anaplasia. Quanto ao tipo celular e atividade, os tumores são classificados como osteoblásticos, fibroblásticos ou condroblásticos²⁹.

A precisão diagnóstica na maioria das vezes é um difícil e longo caminho a ser percorrido. O sucesso diagnóstico requer a mobilização e interação entre o corpo clínico veterinário, radiologistas e patologistas, que aliados ao emprego de modernos equipamentos de imagem, bem como às técnicas de análises moleculares, conferem relevantes complementos ao estudo da doença, visto que permitem uma profunda investigação, direcionam o paciente ao tratamento adequado e específico que corroboram o prognóstico da doença²⁸.

2.2.3. Novas perspectivas de tratamento do osteossarcoma com substâncias fitoterápicas

Usualmente, a ressecção cirúrgica do osso acometido e de tecidos adjacentes com margem de segurança, é o primeiro procedimento realizado em cães para o aumento da sobrevida, alívio da dor e tentativas de redução dos índices de metástases. Para o tratamento pós-imediato à amputação do membro, são empregados agentes antineoplásicos, como por exemplo, e via de regra, a quimioterapia combinada utilizando-se agentes citostáticos. A doxorrubicina, a cisplatina e a carboplatina são fármacos quimioterápicos que provem melhores resultados aos animais, pois possuem ação efetiva na redução da capacidade de promover metástases e, conseqüentemente, diminuir os índices de mortalidade entre os pacientes tratados. Contudo, há relatos que estes fármacos também possuem efeito tóxico. A aplicação de radioterapia é considerada um método paliativo para alívio da dor durante o tratamento; entretanto os melhores benefícios desta vêm por meio de sua combinação com a quimioterapia^{8,30}.

Nos últimos anos, diversos compostos naturais têm sido pesquisados como alternativas aos elevados custos e aos diversos efeitos colaterais dos medicamentos quimioterápicos disponíveis no mercado mundial. Dentre tais compostos, destacam-se, no Brasil e no mundo, os fitoterápicos, medicamentos extraídos de fontes renováveis e naturais, disponíveis e conhecidas da humanidade há milhares de anos. Diversos relatos de pesquisas com extratos de plantas comprovam o potencial da utilização de biomoléculas de origem vegetal como antineoplásicos^{31,40}.

Foi comprovada atividade citotóxica do extrato etanólico da planta *Artemisia annua*, conhecida popularmente como losna ou absinto, em cultura de células leucêmicas humanas, o que indica potencial aplicação para o tratamento do câncer. No entanto, para que sejam realizados estudos *in vivo*, é necessária a padronização dos extratos³¹.

O efeito inibitório de compostos fenólicos e terpenóides de *Baccharis trimera*, a popular carqueja, foi avaliado em cultura de células tumorais de cérvix uterina humana (SiHa). A supressão da formação de colônias de forma dose-dependente, a inibição da proliferação e da motilidade celular e a morte celular por necrose foram resultantes do tratamento com a utilização do composto fenólico. Por outro lado, no tratamento com o composto terpenóide, foi inibida a proliferação das células também de maneira dose-dependente, porém ocorreu o aumento da formação de colônias e a não inibição da motilidade celular. Esse composto também induziu à apoptose celular. Diante disto, essas substâncias se apresentam como possibilidades futuras no tratamento contra o câncer³².

A atividade antitumoral de extrato bruto hidroalcólico e frações de solventes de clorofórmio, etil-acetato e metanol obtidos a partir da parte aérea do vegetal *Bidens pilosa* (picão preto) foi avaliada *in vitro* e *in vivo* em modelo experimental com a utilização de camundongos com carcinoma de Ehrlich. O extrato bruto hidroalcólico demonstrou atividade tumoral apenas em altas dosagens. Já o extrato clorofórmico apresentou elevada atividade antitumoral com apresentação de alta citotoxicidade *in vitro*, aumento da expectativa de vida dos camundongos portadores de tumor e decréscimo das atividades de lactato desidrogenase (LDH) e Glutathione (GSH) no fluido tumoral. A via de administração utilizada foi a intraperitoneal, portanto são necessários novos estudos que abordem outras vias de administração³³.

A inibição da atividade tumoral pelo extrato bruto hidroalcólico e de fração clorofórmio da planta *Casearia sylvestris* (guaçatonga) foi investigada em linhagem celular de câncer de mama humano MCF-7 e *in vivo* em modelo experimental com camundongos com tumor de Ehrlich. Os tratamentos causaram a ativação de p53, p16 e causaram danos ao DNA das células tumorais. O extrato hidroalcólico inibiu significativamente o crescimento tumoral nos camundongos em 40%, enquanto o extrato clorofórmico, mais efetivo, inibiu em 60%. Foi utilizado o ensaio de viabilidade celular pelo método de Azul de Tripán, registrando-se baixa celularidade em animais tratados. Em alta concentração, os extratos dessa planta são citotóxicos e em menor concentração possuem efeito antiproliferativo, o que sugere possível utilidade na complementação ao tratamento quimioterápico convencional³⁴.

Foi analisado o efeito antitumoral do extrato etanólico a partir do fruto, folha e resina da *Garcinia mangostana* L., o mangostão, em cultura de células de melanoma B16-F10 para determinar a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT

(redução de tetrazólio) e efeito genotóxico por ensaio cometa. O extrato da folha induziu genotoxicidade e apoptose nas células tumorais e houve o decréscimo da taxa de proliferação celular, tendo sido identificada a fragmentação de DNA no ensaio cometa³⁵.

O vegetal *Himatanthus articulatus* (sucubúba) foi pesquisado quanto à atividade antiproliferativa de seu extrato bruto e suas frações contra diversas linhagens de células tumorais humanas (adenocarcinoma de cólon HT-29, adenocarcinoma de ovário OVCAR-3, carcinoma de células renais RXF-393, câncer de mama MCF-7, tumor de células gigantes pulmonares H460). Foi demonstrado que o extrato bruto possui baixa citotoxicidade; no entanto, a fração clorofórmica possui alta atividade citotóxica comparada ao controle positivo³⁶.

Diversas espécies de plantas (351) foram testadas quanto citotoxicidade de seus extratos contra células neoplásicas pulmonares de humanos pelo método colorimétrico sulforonamina B (SRB) das seguintes linhagens: NCI-H460, KM-12, SF-268 e RPMI-8226. Expressiva atividade citotóxica foi identificado no extrato das seguintes espécies: *Amphirrhox sp.*, *Calophyllum brasiliense* (guanandi ou jacareúba), *Caryocar microcarpum* (pequiá ou pequirana), *Distictella magnoliifolia* (trombeta), *Macoubea sprucei* (amapá), *Toulicia polvinata*, *Vismia guianensis* (capianga) e *Xylopia aromática* (pimenta-de-macaco)³⁷.

A citotoxicidade de diversas plantas das florestas Amazônica e Atlântica foi avaliada contra células de carcinoma de células escamosas pelo método colorimétrico sulforonamina B (SRB) em linhagem KB-ADL12. Atividade significativa de citotoxicidade foi registrada para extratos das plantas *Abarema auriculata* (abarema), *Laetia suaveolens*, *Picrolemma sprucei* (caferana)³⁸.

O extrato etanólico da casca de pequi possui concentração de fenóis de 209,37 g GAE.kg⁻¹ e o extrato aquoso possui 208,42 g GAE.kg⁻¹. No ensaio de IC50 para o extrato aquoso da casca de pequi foi demonstrado. No entanto, o extratos etanólico apresentou valor de IC50 (µg.mL⁻¹.m.v⁻¹) de 9,44 ± 0,30 e o aquoso de 17,98 ± 0,35 o que demonstra alta atividade antioxidante com potencial capacidade de sequestro de radicais livres, atribuídos a alta concentração de fenóis³⁹.

A planta *Uncaria tomentosa* (unha de gato) é planta medicinal nativa da Floresta Amazônica peruana que possui atividade antioxidante e tem capacidade para promover reparos a danos no DNA. O extrato obtido desse vegetal foi testado quanto à sua ação sobre células formadoras de colônias (CFC) e na recuperação de neutropenia

pós tratamento quimioterápico associado a Filgrastim. Foi demonstrado *in vivo* por meio de aplicação intraperitoneal que o uso dessa planta aumenta significativamente a contagem neutrofílica. *In vitro*, foi comprovado o aumento da formação de colônias de granulócitos e macrófagos. A *Uncaria tomentosa* nas diferentes doses testadas têm efeito positivo como progenitor mieloide e apresenta-se como promissora para o uso na quimioterapia de maneira a minimizar os efeitos adversos deste tratamento⁴⁰.

Foi analisada a citotoxicidade de extrato etanólico da casca de pequi e foi estimado o valor de IC_{50} $3731,3 \pm 579 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$, tendo sido constatada baixa citotoxicidade deste extrato. Neste caso, o extrato foi testado em fibroblastos humanos normais da linhagem 3T3⁴¹.

2.3. Bioma Cerrado

Conceituado com a mais rica savana em todo mundo, o bioma cerrado em virtude de sua grandiosa biodiversidade, é composto por paisagens diversas, grande variedade de plantas nativas e espécies animais. Ocupa uma extensão de dois milhões de quilômetros quadrados, ou seja, um quarto de todo o território brasileiro, no qual, a maior concentração de área está situada no Planalto Central do Brasil. A distribuição geográfica do Cerrado abrange parte de alguns estados nas regiões Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal), Norte (Tocantins, Pará, Amapá, Rondônia, Amazonas, Roraima), Sul (Paraná), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Nordeste (Bahia, Piauí, Maranhão e Ceará). A vegetação no cerrado é marcada por fatores climáticos típicos que desencadeiam alterações na paisagem natural causadas pelo fogo em épocas de seca, e hoje, principalmente com extensivas áreas de desmatamento submetidas às atividades antrópicas ligadas à criação de bovinos e agricultura⁴².

O Cerrado brasileiro é reconhecido como uma importante fonte de recursos biológicos nativos principalmente no que se refere às plantas frutíferas, medicinais e ornamentais, que conferem grande potencial econômico local a esse importante bioma. É constituído por identidades complexas e diferentes fitofisionomias. Duas estações climáticas são predominantes no cerrado, uma chuvosa que acontece de outubro a março e outra seca, de abril a setembro. Análises de solos sob o ponto de vista físico-químico, biológico, hídrico evidenciam uma grande diversidade, nota-se que as queimadas naturais são frequentes em diferentes regiões, tais características influenciam diretamente na estrutura e composição química de plantas nativas do cerrado⁴³.

Na região Centro-Oeste, em particular o Estado de Goiás, o cerrado é o principal tipo de vegetação nativa, agraciado por uma rica natureza, que apesar de toda diversidade ecológica, manancial hídrico e, importante mecanismo sócio cultural, é uma área que está progressivamente sendo devastada e descaracterizada pelo crescente avanço da fronteira agrícola. Árvores típicas dessa vegetação estão sendo extintas pela extração de carvão vegetal e substituída por pastagens artificiais e monocultura como a soja, eucalipto e cana de açúcar. Essas modificações comprometem drasticamente a biodiversidade, além de ser uma constante ameaça à cultura e a base de subsistência de comunidades indígenas, quilombolas, ribeirinhos entre outros, em um ritmo que caso persista sem a devida conservação e proteção, poderá extinguir o bioma até 2030⁴³. Entre outras consequências, a mais devastadora é a perda do potencial terapêutico de sua biodiversidade vegetal, amplamente explorado pela sabedoria popular, mas de tímida expressão científica^{44,45}.

2.3.1. Fruto do Pequi (*Caryocar brasiliense*)

Dentre as plantas nativas do Cerrado pode ser encontrado o pequizeiro, cujo fruto chamado pequi recebe a classificação taxonômica de *Caryocar brasiliense* orientado pelo *The Angiosperm Phylogeny Group* (APG) II (2003) com a seguinte hierarquia: Divisão-Angiospermas; Clado-Eurosídeas I; Ordem-Malpighiales; Família-Caryocaraceae; Gênero-*Caryocar*; Espécie-*Caryocar brasiliense* Cambess. Na Etimologia, o gênero *Caryocar* origina-se do grego *caryon* (núcleo ou noz) + *kara* (cabeça), em referência ao fruto de tamanho globoso; o epíteto específico, *brasiliense*, por ser uma espécie de origem nativa do Brasil. O nome do pequi foi assim denominado pela cultura tupi, *py* (pele) + *qui* (espinho), em menção aos espinhos presentes internamente no caroço. O pequi na cultura popular recebe denominações similares em diferentes estados do Brasil como: no Estado de Goiás, pequi, em São Paulo, pequi e piqui; em Minas Gerais, pequi-do-cerrado; na Bahia, pequiá, pequiá-vermelho e pitiá; em Mato Grosso, piqui; em Mato Grosso do Sul, pequi⁴⁶.

O pequizeiro é uma árvore natural do cerrado e, pode ser encontrado no percurso de todo o bioma Cerrado. Árvore rústica decorrente das frequentes queimadas em períodos de seca possui uma copa frondosa que pode chegar até 10 metros de altura, é composta tipicamente por galhos grossos e tortuosos, o tronco é recoberto por casca grossa, de cor acinzentada com fissuras longitudinais. As folhas são compostas,

trifolioladas, com pontas entrecortadas e recobertas por densa pilosidade. As flores são exuberantes e medem aproximadamente oito centímetros, são compostas por cinco pétalas individuais e esbranquiçadas, com abundantes estames. A inflorescência e, os primeiros frutos do pequiizeiro surgem entre os meses de agosto a novembro, os frutos maduros são coletados a partir de setembro até meados de fevereiro. A madeira do pequiizeiro é de excelente resistência contra ataques por cupins de madeira seca, tais como o *Cryptotermis brevis*⁴⁷.

A casca e as folhas fornecem pigmento amarelo e a casca é comumente usada em curtume. Estudos relatam que o consumo do fruto adia os efeitos danosos provocados por radicais livres, bem com resguarda as células dos efeitos colaterais das drogas quimioterápicas no tratamento contra o câncer⁴⁸. De expressiva importância econômica, cultural, gastronômica, ecológica, medicinal, o pequiizeiro é uma espécie protegida pela legislação federal, e, o corte predatório do pequiizeiro e comercialização da madeira são proibidos em todo o território nacional (Figura 1)⁴⁹.



FIGURA 1 – Pequiizeiro (*Caryocar brasiliense camb*) nativo em vegetação típica do bioma Cerrado.

Fonte: www.caliandradocerrado.com.br

O pequi em sua morfologia é composto por quatro porções: exocarpo, mesocarpo externo, mesocarpo interno, endocarpo espinhoso. O exocarpo compreende a porção externa da casca, com coloração esverdeada que pode variar a tonalidade ao marrom por consequência do amadurecimento do fruto. O mesocarpo externo está intimamente ligado ao exocarpo é constituído por espessa polpa branca que, por sua

vez, é aderido ao mesocarpo interno, de coloração amarelo claro a alaranjado intenso a porção comestível do fruto. O endocarpo espinhoso é formado por inúmeros espinhos finos e pequenos que abriga em seu interior a semente do pequi que é envolvida por uma fina película marrom, destaca-se por ser muito apreciada por seu sabor (Figura 2)⁵⁰.

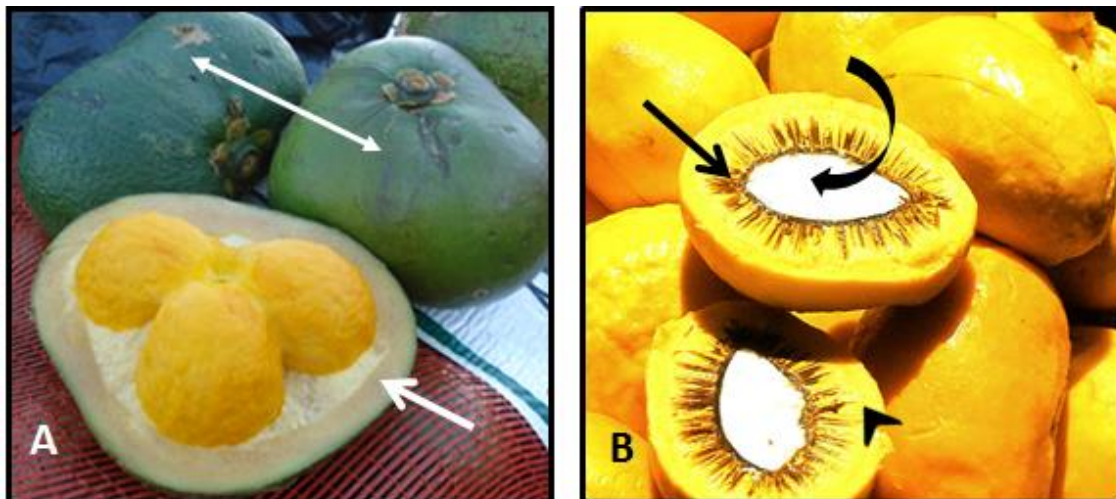


FIGURA 2 - Aspectos morfológicos do pequi (*Caryocar brasiliense*). A. Seta dupla, representa o exocarpo (casca) do fruto globoso, de coloração esverdeada. Seta simples, é o mesocarpo externo ou polpa branca. B. Cabeça de seta, mesocarpo interno constituído da porção comestível do fruto do pequi, de coloração alaranjado intenso. Seta simples é o endocarpo espinhoso com inúmeros espinhos entremeados. Seta curva, identifica a semente na parte interna do fruto. Fonte: Alves et al.⁵⁰.

O pequi (*Caryocar brasiliense*) é um fruto com grande importância na culinária regional. O óleo extraído da polpa de pequi é amplamente usado na medicina popular como agente tônico contra asma, gripe, resfriado e doenças bronco pulmonares. Porém, existem poucos estudos para estabelecer a atividade biológica deste fruto e a viabilidade do uso na medicina. *In vitro* foi observada a ação antifúngica das diversas partes do fruto como folhas e sementes contra *Cryptococcus neoformans*⁵¹. Verificou-se em estudos de propriedades químicas e de composição que o pequi possui alta concentração de fenóis, como ácido gálico, ácido quínico, quercetina e quercetina 3-O-arabinose. Extrato do tipo aquoso e etanólico da casca de pequi demonstraram capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS e ERNS)^{39,52}. Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, como os flavonoides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade

protetora contra doenças cardiovasculares, ao inibirem a lipoperoxidação agem contra a ação dos radicais livres mecanismos que são atribuídos ao envelhecimento celular⁵³.

O pequi compreende importante fonte de nutrientes que compõe a base alimentar de diversas populações do Centro-Oeste. A casca do fruto compreende o exocarpo e mesocarpo externo (polpa branca) que compõe 75,2% de sua matéria orgânica³⁹. O fruto apresenta alto teor de lipídeos com valores que oscilam de 27 a 35 g.100 g⁻¹. A polpa do pequi possui de 250 a 350 kcal.100 g⁻¹ o que representa um alimento com boa fonte energética. A polpa também é considerada uma fonte potencial de antioxidantes, além disso, possui ácidos graxos, no qual 60% destes são insaturados com predomínio do ácido oleico, entre os minerais são destacados a presença de fósforo, zinco e magnésio que beneficiam à saúde⁵⁰.

Testes farmacológicos com amostras de diferentes partes do pequizeiro como, por exemplo, cascas retiradas do tronco, folhas, e o próprio fruto demonstraram que o pequi apresenta vitaminas A, C, E, betacarotenos, lipídeos entre outros que beneficiam à saúde humana, pois agem no sistema endócrino, muscular, ósseo, imunológico (Tabelas 1 e 2)^{54,55,56}.

TABELA 1 – Propriedades físicas do pequi

Parâmetros	Média
Peso por fruto (g)	76,41
Peso de caroço por fruto (g)	30,75
Peso de polpa por fruto (g)	7,41
Peso das sementes por fruto (g)	22,87
Diâmetro longitudinal (mm)	32,17
Diâmetro equatorial (mm)	41,16
Rendimento de polpa (%)	8,98
Rendimento de caroço (%)	28,81
Rendimento em casca (%)	61,66

Fonte: Carrazza e Avila⁴⁶

TABELA 2 - Propriedades químicas do pequi

PARÂMETROS	QUANTIDADE POR PORÇÃO DE 100 G DE POLPA
Umidade (%)	50,61
Proteínas (%)	4,97
Gordura (%)	21,76
Cinza (%)	1,1
Fibra (%)	12,61
Carboidratos (%)	8,95
Calorias Kcal/100g	251,47
Cálcio (mg/100g)	0,1
Fósforo (mg/100g)	0,1
Sódio (mg/100g)	9,17
Vitamina C (mg/100g)	103,15

Fonte: Carrazza e Avila⁴⁶

2.4. Cultura de células e citotoxicidade

Cultura celular é o termo utilizado para o isolamento de organismos celulares dispersos a partir de um tecido vivo primário, de cultura primária ou de uma linhagem celular. É uma técnica que foi desenvolvida no início do século XX, com objetivo de compreender, sob o microscópio, eventos celulares normais, como a exemplo, o desenvolvimento de células nervosas. Por mais de 50 anos, as células foram obtidas de tecido primário, desta forma o método foi denominado por cultura de tecidos. Com o aprimoramento da técnica em meados de 1950 e crescente demanda por cultivos celulares o termo foi substituído por cultura de células que possibilitou a prática de proliferações *in vitro* de variados tipos celulares⁵⁸.

Entre os anos de 1940 e 1950 houve a necessidade do cultivo de células animais, devido aos surtos epidêmicos de pólio que motivaram os pesquisadores a desenvolverem vacinas contra o vírus. O vírus da pólio em 1949 foi isolado, inativado e reproduzido em cultura de células humanas, grandes quantidades de vacinas foram desenvolvidas. A vacina contra pólio se tornou um dos primeiros produtos desenvolvido e comercializado com o advento de cultura de células animais⁵⁹.

As proliferações de células vivas de animais e vegetais podem continuar a crescer *in vitro* desde que sejam supridas todas as necessidades fisiológicas e nutricionais das células fornecidas por um composto líquido denominado por meio de cultura. O meio de cultura é composto por diferentes componentes, basicamente é

constituído por sais inorgânicos como cálcio, ferro, magnésio, potássio, entre outros, aminoácidos essenciais e não essenciais, antibióticos, vitaminas, glicose e um indicador de pH como o fenol red, por exemplo. Este composto é específico para cada tipo celular, é imprescindível à sobrevivência, crescimento e proliferação celular. O controle rigoroso do ambiente onde será promovida a cultura é de suma importância; deve ser asséptico para ser livre de agentes contaminantes, devem ser mantidos constantes parâmetros como temperatura, umidade, oxigênio e gás carbônico, fatores que contribuem para o sucesso da cultura celular⁵⁸.

O tecido de origem celular determina o protocolo de cultivo a ser seguido, dessa maneira, o crescimento e proliferação celular pode ser realizado em garrafas apropriadas para o cultivo, tanto para células suspensas quanto para células aderentes em meio de cultura. O crescimento de células suspensas é derivado de linhagens originais que não necessitam de adesão ao substrato para proliferação, a exemplo: células hematopoiéticas. No entanto, células aderentes podem ser do tipo mesenquimais, cardíacas, nervosas, epiteliais, fibroblastos, tumorais, além de outras. Estas crescem aderidas ao fundo da garrafa e formam monocamadas. Células aderentes têm a necessidade de se conectarem ao substrato para se dividirem e crescerem, é uma ligação essencial, no qual, esta ancoragem ao substrato não deve ser rompida, pois ocorrerá a interrupção da proliferação e subsequente morte celular⁵⁹.

A aplicação de pesquisas *in vitro* é ampla e pode ser desenvolvida a partir cultura de células animais e vegetais, dentre estas são citadas: os estudos fisiológicos e bioquímicos de células normais e tumorais; avaliação dos efeitos de composições químicas ou fármacos diversos sobre tipos específicos de células; para a geração de tecidos artificiais; síntese de materiais biológicos, síntese de proteínas recombinantes glicosiladas, as quais não podem ser produzidas por bactérias, uma vez que estas não possuem o metabolismo necessário, entre outras⁵⁹.

A restrição de uso animal em laboratórios é causa de múltiplas discussões, fato que diante disso, a comunidade científica mundial sofre constante pressão para que seja efetuada a substituição de ensaios *in vivo* por ensaios *in vitro* que promovam e preservem o bem estar animal. Testes *in vitro* são padronizados sob rigor de critérios para análise de princípios tóxicos presentes nos mais variados materiais, em substâncias extraídas de plantas ou sintetizadas em laboratórios, que causam danos de citotoxicidade ao organismo quando aplicados na clínica de humanos e animais⁶⁰.

Ensaio de citotoxicidade resultam por meio de diferentes técnicas na adição de uma substância direta ou indiretamente sobre células de mamíferos em cultura, com a liberação de substâncias nocivas que causem toxicidade nas amostras celulares. Após um período seja permitido observar as alterações celulares por diferentes mecanismos quer sejam por meio de uso de corantes vitais ou pela inibição da constituição de colônias celulares. Testes de citotoxicidade são realizados com eficácia e permitem de modo rápido, a reprodução de células em cultura, são financeiramente viáveis e sensíveis a biocompatibilidade *in vitro*. O ensaio citotoxicidade viabiliza a análise do efeito tóxico ou antiproliferativo de amostras em cultura de células. Portanto, são de extrema relevância ao desenvolvimento de produtos químicos, físicos, farmacêuticos, biológicos, alimentícios entre outros, propostos ao uso humano ou animal⁶¹.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do experimento

Este estudo foi desenvolvido na Universidade Federal de Goiás (UFG), no Laboratório Multiusuário de Cultivo Celular (LMCC) do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ). As células de osteossarcoma osteogênico metastático canino (D-17, BCRJ 0276, Lote 000573, Passagem 239) originárias da ATCC (American Type Culture Collection - Manassas, VA, EUA) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ – Rio de Janeiro, Brasil). Os frutos de pequi maduros foram adquiridos no comércio local da região de Goiânia, a preparação das cascas foi realizada no Departamento de Nutrição Animal. O extrato etanólico da casca de pequi (EECP) foi produzido no LMCC e a análise físico-química de sua composição realizada na Faculdade de Farmácia da mesma Universidade.

3.1.1. Células e cultivo celular

Para a realização deste estudo, células de OSC osteogênico metastático canino (D-17, BCRJ 0276, Lote 000573, Passagem 239) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ – Rio de Janeiro, Brasil) originárias da ATCC (American Type Culture Collection - Manassas, VA, USA). As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂. Para o cultivo celular foi utilizado o meio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina (10.000 U.I./ml - 10 mg/ml), anfotericina B e L glutamina (todos os reagentes da Cultilab, Campinas, Brasil), de acordo com adaptação de YU et al⁶².

3.1.2. Obtenção do extrato etanólico da casca do pequi (*Caryocar brasiliense*)

O extrato etanólico da casca do pequi (EECP) foi obtido de acordo com a técnica descrita por Lima⁶³. Os frutos de pequi foram obtidos na Central de Abastecimento de Goiás (Ceasa-GO), em perfeitas condições morfológicas e no ponto ótimo de maturação, em seguida foram higienizados com água e sabão neutro, em seguida, para fins de separação manual das cascas. As cascas foram picadas numa espessura de aproximadamente 4mm e levadas à estufa com ar forçado a 60°C por 72 horas. Após secagem das cascas, o material foi triturado em moinho analítico

padronizado em granulometria de 60 mesh (0,25mm) e armazenado a -20°C, protegido da luz. Para a obtenção do extrato foi utilizado 1000g do farelo da casca de pequi e adicionado a 1000 ml de etanol a 95% (5:95 de água:etanol), a mistura resultante passou por percolação a frio e agitação por 1 (uma) hora, posteriormente o produto foi centrifugado a 4000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e o solvente evaporado em rotoevaporador à pressão reduzida, resultando no extrato etanólico bruto, que foi armazenado a -4°C e protegido da luz.

Foram utilizados 300 kg de fruto que resultaram 180 kg de casca de pequi. O rendimento de casca seca, triturada e moída em moinho analítico foi de aproximadamente 9 kg de farelo de casca de pequi. A percolação foi realizada no Laboratório Multiusuário de Cultivo Celular do PPGCA/EVZ/UFG, no qual 1 kg do farelo da casca de pequi foi percolado por 8 horas. Ao final de todo o processo foram obtidos aproximadamente 3 litros de extrato etanólico da casca de pequi (EECP), utilizado para o experimento. Posteriormente, o extrato foi submetido à análise físico-química na Faculdade de Farmácia da UFG (Quadro 2).

QUADRO 2 - Parâmetros físico-químicos analisados do extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*).

PARÂMETRO ANALISADO	VALOR ENCONTRADO
Densidade média	23,9015g/L
Concentração média	29,19 g/L
pH médio	5,7
Densidade de extrato bruto ativo	275,72 mg GAE/mL
Concentração de fenóis totais	83,10 mg GAE /mL (30,14% do extrato ativo)
Concentração de taninos	18,47 mg GAE /mL (22,23% dos fenóis do extrato ativo)
Concentração de Flavanóides	4,78 mg GAE /mL (5,75% dos fenóis do extrato ativo)
Outros fenóis	59,85 mg/mL (72,02% dos fenóis do extrato ativo)

Legenda: GAE – equivalente em ácido gálico.

3.1.3. Delineamento Experimental

As células de osteossarcoma canino foram semeadas em placas de cultura e submetidas ou não a tratamentos com o EECP, de acordo com a concentração previamente preparada, como descrito no Quadro 2. Todos os ensaios foram realizados

com três experimentos independentes, em triplicata. Os compostos de teste foram diluídos em DMSO (Dimetilsulfóxido, Cultilab, Campinas, Brasil) e as soluções de estoque foram preparadas com 1 µl e armazenadas a -20°C.

QUADRO 3 – Concentrações e tempo de exposição das células de osteossarcoma ao extrato etanólico da casca de pequi.

GRUPO	QUANTIDADE DO EXTRATO ACRESCENTADA (µl)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (h)
I - A	0 (Controle Negativo)	24
I - B	0 (Controle Negativo)	48
I - C	0 (Controle Negativo)	72
II	0,1µl	24
III	1,0µl	24
IV	10µl	24
V	0,1µl	48
VI	1,0µl	48
VII	10µl	48
VIII	0,1µl	72
IX	1,0µl	72
X	10µl	72

3.1.4. Análise de Viabilidade Celular

a) Método de Exclusão de Azul de Tripán

A avaliação foi feita por meio de adaptação da técnica usada por Mosman⁶⁴ e Peres & Curi⁶⁵. Placas de 96 poços foram utilizadas para cultivar as células na concentração de 1×10^4 células/poço por 24 horas em incubadora umidificada a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Os tratamentos com o EECP foram feitos com as dosagens de 0,1 µl, 1,0 µl, 10 µl e grupo controle (GC) negativo por três diferentes períodos para cada concentração, por 24 h (G24), 48 h (G48) e 72 h (G72). Em seguida, o meio de cada poço foi descartado e as células foram suspensas com 100 µl de tripsina (Cultilab, Campinas, Brasil), após lavagem com salina fosfatada tamponada Dulbecco (DPBS, Life technologies, EUA). A tripsina foi inativada com o acréscimo de 100 µl de

meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. O material foi centrifugado a 130 rcf(g) por 10 minutos, e o meio foi novamente descartado e as células ressuspensas em 100 µl de meio de cultura fresco. Em seguida, 10 µl por poço do volume com células foram transferidos para microtubos tipo eppendorfs contendo 40 µl de azul de tripan (Trypan Blue - Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Foram instilados 10 µl desse preparado em lâmina para a avaliação da viabilidade celular por meio de leitura em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A citotoxicidade (CT) foi determinada pela seguinte equação:

Equação 1:

$$\% \text{ CT} = 100 - [(\text{NC do tratamento} / \text{NC do controle negativo}) \times 100]$$

na qual, CT é a citotoxicidade; e NC é o número de células.

Os valores calculados para cada grupo, foram submetidos a análise de variância pelo Teste F, com nível de significância de 5%, utilizando-se a ferramenta estatística do programa Excel®. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

b) Método de redução do tetrazólio (MTT) para análise da viabilidade celular

A técnica realizada foi adaptada de Yu et al⁶². As células foram cultivadas por 24 horas em placas de 96 poços, com concentração de 1×10^4 células/poço, em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Os tratamentos com EECF foram feitos com as dosagens de 0,1 µl, 1,0 µl, 10 µl e grupo controle negativo, por 24 h (G₂₄), 48 h (G₄₈) e 72 h (G₇₂). Ao final do período de tratamento, o meio foi desprezado e foi acrescentado 10 µl de tetrazólio (MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-diphnyl-2H-tetrazólio) em cada poço. As placas foram incubadas por um período de três horas. Com o objetivo de finalizar a reação, foram acrescentados 50 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS – Vivantis Biochemical, CA, USA) a 10%, diluído em HCl (0,01N) por poço e as placas permaneceram incubadas por 24 horas em temperatura ambiente. A densidade óptica foi quantificada em espectrofotômetro (Awareness Technology Inc/ Stat Fax 2100, 425nm – 540nm, Palm City, FL, USA). O valor da concentração que inibe 50% da viabilidade celular (Inhibitory concentration - IC₅₀, em µM) foi determinado com a utilização do programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para o ensaio foram executados três experimentos independentes em triplicata.

3.1.5. Ensaio de sobrevivência celular

O procedimento foi adaptado de Park et al.⁶⁶ e Cao et al.⁶⁷ As células foram cultivadas pelo período de 24 horas em placas de seis poços, com a concentração de 1×10^6 células/poço, em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Os tratamentos com EECP foram feitos com as dosagens de 0,1 µl, 1,0 µl, 10 µl e GC negativo por três diferentes períodos para cada concentração, G₂₄, G₄₈ e G₇₂. Ao término do tratamento, o meio de cada poço foi desprezado e as células suspensas com 500 µl de tripsina. Precedido ao processo de centrifugação a 130 rcf(g) por 10 minutos, o meio foi novamente descartado, as células ressuspendidas em 1 ml de DMEM e cultivadas em placas de seis poços, em incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Após 15 dias, o meio foi desprezado, os poços foram lavados com DPBS e as células quantificadas com o auxílio do corante azul de tripan. O cálculo das frações de sobrevivência foi determinado pela seguinte equação:

Equação 2:

$$\% \text{ FS} = (\text{número de CCAT} / \text{número de CCGC}) \times 100$$

Na qual, FS é a fração de sobrevivência; CCAT é o número de células contadas após tratamento e CCGC é o número de células contadas no grupo controle.

Os dados obtidos foram representados por meio de gráficos e a análise estatística foi concretizada pelo uso do Teste F. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O principal resultado desta pesquisa é que o extrato etanólico da casca do pequi inibe a proliferação de células de osteossarcoma canino de forma dose-dependente e tempo-dependente. Este é um relato inédito, que revela a importância de buscar a identificação de componentes do EECp para o potencial desenvolvimento de fármacos antitumorais.

Os resultados obtidos pelo ensaio de viabilidade celular com o Azul de Tripán são mostrados na Tabela 3. É possível verificar que o tratamento que inibiu de forma mais eficiente foi o grupo no qual foram adicionados 10µl do EECp por 72 horas, resultando em crescimento de 28,20% em relação ao controle, ou seja, uma inibição de 71,80%. De forma similar, foi relatado efeito inibitório de compostos fenólicos de extrato de carqueja (*Baccharis trimera*), em cultura de células tumorais de cérvix uterina humana. No entanto, a inibição foi mais acentuada (86%) e mais rápida (24 h), provavelmente por terem sido utilizados naquele ensaio compostos fenólicos concentrados extraídos da planta, e não o extrato bruto, como o caso do presente experimento³².

TABELA 3 – Ensaio de viabilidade celular pelo método de Azul de Tripán em células de osteossarcoma tratadas com extrato etanólico da casca do pequi (*Caryocar brasiliense*). Os resultados são expressos em percentagem média relativa ao grupo sem tratamento (controle negativo). Letras diferentes em uma mesma linha expressam resultados significativamente diferentes (Teste F, $p < 0,05$). Símbolos diferentes em uma mesma linha expressam resultados significativamente diferentes (Teste F, $p < 0,05$).

TEMPO DE TRATAMENTO	QUANTIDADE DE EECp UTILIZADA		
	0,1µl	1,0µl	10µl
24h	92,70 ^{a*}	97,49 ^{a*}	44,76 ^{b*}
48h	99,19 ^{a*}	98,35 ^{a*}	34,22 ^{b*}
72h	44,76 ^{a†}	34,22 ^{a,b†}	28,20 ^{b,c†}

Ressalta-se que, nos tempos de tratamento com as doses 0,1µl e 1,0µl, os efeitos inibitórios do EECp manifestam-se apenas após 72h. É importante ressaltar que o EECp apresentava em sua composição fenóis, dentre eles os Flavanóides (Quadro 1),

que são substâncias antioxidantes⁵³ e que poderiam ter apresentado ação protetora sobre as células, até a dose máxima de 1µl ou 24 h de exposição.

Considerando a concentração total do EECP utilizada neste experimento (29,19 g/L, equivalente a 29,19 mg/mL ou ainda 29,19 µg/µl – Quadro 1), a dose de 0,1µl apresentava quantidade de solutos totais de 2,92 µg, a de 1µl de 29,2µg e a de 10µl 291,19 µg. Comparativamente, a utilização do extrato de *Casearia sylvestris* (“Guaçatonga”) inibiu o crescimento de células de câncer de mama humano MCF-7 desde 20%, quando tratadas com 2 µg/ml, até 80% quando utilizados 18µg/ml, em um período de 24 horas³⁴. No entanto, no presente experimento, deve ser considerado que as células tratadas foram mantidas durante o período experimental em 100µl de meio de cultivo, o que diluiu em pelo menos 10 vezes a dose utilizada. Outra comparação pertinente é com os efeitos antiproliferativos e citotóxicos do extrato do mangostão, *Garcinia mangostana*, sobre células de melanoma cutâneo, que reduziu significativamente o número de células neoplásicas em dosagens entre 1 e 5 mg/mL³⁵.

Deve ser enfatizada a importância da descoberta de efeitos inibidores da viabilidade celular, ou seja, antiproliferativos, de um extrato obtido de uma importante planta do cerrado brasileiro, o pequi. A maioria absoluta das pesquisas de princípios ativos antineoplásicos de origem da flora brasileira contemplam a vegetação de outros biomas, sendo raras na literatura científica menções a plantas do cerrado nesse tipo de investigação, apesar de sua biodiversidade. Por exemplo, um estudo investigou a citotoxicidade de 351 espécies de 74 famílias de plantas da floresta Amazônica e da Mata Atlântica em diferentes linhagens de células cancerígenas; dos 1220 extratos testados em dose única de 100 µg/ml, 88 mostraram-se ativos³⁷. Nessa mesma linha, células de carcinoma de células escamosas humano foram testadas com 72 diferentes extratos de plantas das mesmas florestas, em concentrações de até 100 µg/mL, sendo identificadas quatro com potencial citotóxico.

Os valores da IC₅₀ são mostrados na Tabela 4. Ainda que o tempo de tratamento de 72 horas tenha apresentado diferença significativa em termos de inibição da proliferação celular, não houve grande diferença em relação aos valores do IC₅₀. Uma possível explicação é que o extrato contém, além de componentes que causam dano celular, antioxidantes (Quadro 1) que poderiam atuar, pelo menos por um certo período, na manutenção da integridade celular; dessa forma, a ação do EECP seria possivelmente mais dependente do tempo de ação do que da dose utilizada.

Os valores médios do IC₅₀ encontrados neste experimento podem parecer

elevados quando comparados aos relatados para outros extratos de plantas utilizados em células neoplásicas com o intuito de promover citotoxicidade. Extratos de *Artemisia annua* (losna) obtidos na China e no Brasil apresentaram valores respectivos de IC₅₀ de 13,79 e 28,23 µg/mL quando adicionados a leucócitos leucêmicos em cultivo³¹, bem inferiores aos encontrados na presente pesquisa. No entanto, esses valores se relacionam ao metabólito artemisinina, que está presente na *Artemisia*, e não à concentração de solutos totais, como o calculado para o EECP por não ser ainda conhecido o metabólito ou metabólitos responsáveis pelo efeito citotóxico.

TABELA 4 - Valores das concentrações que inibem 50% da viabilidade celular (IC₅₀), expressas em µg/µl com seu desvio padrão, e valores convertidos para unidades-padrão internacionais (µg/mL), de acordo com os diferentes tempos de tratamento com o extrato etanólico da casca do pequi (EECP).

TEMPO DE TRATAMENTO	MÉDIA DO IC ₅₀ (µG/µL) – EECP	DESVIO PADRÃO	MÉDIA DO IC ₅₀ (µG/ML) – EECP
24h	0,1798	0,108	179,8
48h	0,1625	0,740	162,5
72h	0,1552	0,63	155,2

Uma consideração importante sobre o EECP utilizado nessa pesquisa é sobre a relação entre o método de extração e a toxicidade do extrato. O EECP foi preparado de acordo com Lima⁶³ de forma a garantir a extração máxima de fenóis com efeitos antioxidantes, conforme preconizado por Roesler³⁹. É possível, porém, que se outros métodos de extração tivessem sido empregados, o resultado do IC₅₀ poderia ter sido inferior ao obtido, em todos os tempos experimentais utilizados. Esse argumento é corroborado pelo relato de que a IC₅₀ do extrato de *Bidens pilosa* (picão preto) variou desde 944,2 µg/mL quando utilizada extração hidroalcolico até 97 µg/mL no caso de extração com clorofórmio como solvente³³. Também reforçam esse ponto de vista os dados de IC₅₀ para a ação citotóxica de *Casearia sylvestris* (Guaçatonga) sobre células MCF-7 de câncer de mama: 141 mg/mL para o extrato total, semelhante ao presente trabalho, e 66 mg/mL para o extrato clorofórmico.

Outro fator crucial na interpretação dos resultados obtidos para a IC₅₀ do EECP é o tipo celular nesta pesquisa, células de osteossarcoma da linhagem D-17.

Espera-se que futuros trabalhos de pesquisa que empreguem diferentes células tumorais apresentem valores de IC_{50} para este extrato significativamente diferentes. Essa afirmativa se sustenta a partir do informe de que a utilização do extrato bruto de *Himatanthus articulatus* (sucuúba) para inibir o crescimento de células neoplásicas de diferentes linhagens gerou valores de IC_{50} bastante diversos, em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: HT-29 (adenocarcinoma de cólon - 42.3 ± 6.3); NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não-pequenas - 27.3 ± 2.0); MCF-7 (câncer de mama - 82.0 ± 1.6); OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovário - 86.3 ± 9.1) e RXF-393 (carcinoma renal - 40.5 ± 5.4)³⁶.

Paradoxalmente, um dos possíveis metabólitos do EECp que podem apresentar efeitos citotóxicos são os próprios fenóis. Já foi relatado que o extrato da popular carqueja (*Baccharis trimera*) apresentou efeito antiproliferativo contra células de câncer cervical humano após 24 horas de tratamento, tendo sido calculada a IC_{50} para a fração fenólica do extrato em $482 \mu\text{g}/\text{mL}$ ³². Considerando a análise do EECp apresentada no Quadro 1, a fração correspondente aos taninos pode ser o grupo fenólico responsável pelos efeitos citotóxicos apresentados pelo EECp. Apesar de possuírem propriedades antioxidantes, os taninos também apresentam atividades tóxicas, provavelmente, devido à habilidade de ligar-se às proteínas e outras macromoléculas, além de se complexarem facilmente com íons metálicos como o ferro⁶⁸.

Conforme observado neste estudo, o conteúdo de taninos do EECp equivaleu a 22,23% do total de fenóis do extrato. Em um trabalho realizado também com células de osteossarcoma, foi testada a atividade antitumoral do extrato bruto da planta chinesa *Caulis spatholobi*. Os resultados demonstram uma inibição da proliferação celular de 65% a uma dosagem de $3,5\text{mg}/\text{mL}$, maior do que a verificada neste estudo; porém, o mais interessante foi que a inibição foi maior justamente no método de extração que obteve a maior quantidade de taninos⁶⁹. Tais resultados, obtidos em uma condição semelhantes aos da presente pesquisa em relação ao tipo celular empregado, permitem inferir que os taninos possuem um importante papel na diminuição da viabilidade celular causada pelo EECp, particularmente após 72 h de tratamento.

O ensaio de sobrevivência celular foi utilizado para avaliar a capacidade de proliferação celular após a exposição ao EECp. Ao final dos períodos de exposição às diferentes concentrações, o EECp foi retirado e as células permaneceram em cultivo por 15 dias. Com o cálculo das frações de sobrevivência presumiu-se que o crescimento celular, após o tratamento, foi menor (3,33 %) no grupo tratado por 72 horas com a

concentração de 10 µl. O mesmo não ocorreu com o grupo tratado por 48 horas com a concentração de 1,0 µl, que apresentou 87,50 % de fração de sobrevivência. Uma possível explicação é que a quantidade de fenóis antioxidantes presentes no EECp tenha sobrepujado os efeitos deletérios de outros compostos, principalmente dos taninos⁶⁹.

Para testar a probabilidade das variâncias serem significativamente diferentes, os resultados das frações de sobrevivência foram analisados pelo Teste F ($p=0,0003$) e Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Não houve diferença estatística significativa entre os resultados encontrados nas diferentes concentrações do grupo exposto por 24 horas ao EECp. Os resultados referentes à concentração de 10 µl obtiveram diferença estatística significativa das demais concentrações nos períodos de 48 e 72 horas. No entanto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos que receberam tratamento com a concentração de 10 µl nos diferentes tempos de exposição. Conclui-se que houve menor crescimento celular após o tratamento com 10 µl nos diferentes tempos de exposição. Analogamente, colônias de células SiHa (células tumorais cervicais imortalizadas) foram avaliadas 10 dias após o tratamento com extrato de *Baccharis trimera*; a utilização de 200 µg/mL da fração fenólica reduziu a sobrevivência clonogênica em $4\% \pm 0.57$ ³².

Pela história da medicina, os produtos originados a partir de vegetais têm se revelado como fontes valiosas de drogas antitumorais. Exemplos são o alcalóide vinca, os texenos e as camptotecinas, derivados das plantas *Catharanthus roseus*, do Madagascar, da *Taxus brevifolia*, do Pacífico, e da árvore chinesa *Camptotheca acuminata*, respectivamente⁷⁰. O cerrado, um patrimônio natural da humanidade, pode fazer parte desta história a partir da realização de mais estudos que permitam o desenvolvimento de fármacos antitumorais mais seguros e acessíveis a partir do pequi e de outras plantas deste importante bioma do centro oeste brasileiro.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que o extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) possui efeito citotóxico sobre as células de osteossarcoma canino da linhagem D-17.

O extrato promove redução da viabilidade celular de forma dependente do tempo de exposição por 72 horas e na concentração 10 µl do extrato utilizado.

REFERÊNCIAS

1. Zachary JF, McGavin MD. Bases da patologia em veterinária. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. 1344p.
2. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan; 2013. 558p.
3. Alfranca A, Martinez-Cruzado L, Tornin J, Abarrategi A, Teresa Amaral T, Alava E, Menendez P, Garcia-Castro J, Rodriguez R. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015;72:3097-3113.
4. Withrow SJ, Wilkins RM. Cross talk from pets to people: translational osteosarcoma treatments. *Ilar J.* 2010;51:208-213.
5. Osborne TS, Khanna CA. Review of the association between osteosarcoma metastasis and protein translation. *J Comp Pathol.* 2012;146:132-142.
6. Fenger JM, London CA, Kisseberth WC. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *Ilar J.* 2014;51(1):69-85.
7. Davis BW, Ostrander EA. Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach. *Ilar J.* 2014;55(1):59-68.
8. Szewczyk M, Lechowski R, Zabielska K. What do we know about canine osteosarcoma treatment. *Vet Res Commun.* 2015;39(1):61-67.
9. Selvarajah GT, Kirpensteijn J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *Vet J.* 2010;185(1):28-35.
10. Hofstaetter JG, Roschger A, Puchner S, Dominkus M, Sulzbacher I, Windhager R, Klaushofer K, Roschger P. Altered matrix mineralization in a case of a sclerosing osteosarcoma. [Acesso em: 12 de dezembro de 2015]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2012.12.043>. 2013
11. Ouyang L, Liu P, Yang S, Ye S, Xu W, Liu X. A three-plasma miRNA signature serves as novel biomarkers for osteosarcoma. *Med Oncol.* 2013;30:1-7.
12. Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orph Jour of Rare Dis.* 2007;2(6):1-4.
13. Castro HC, Ribeiro KCB, Bruniera P. Osteossarcoma: experiência do serviço de oncologia pediátrica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. *Rev Bras Ortop.* 2008;43(4):108-15.
14. Rankin KS, Starkey M, Lunec J, Gerrand CH, Murphy S, Biswas S. Of Dogs and Men: comparative biology as a tool for the discovery of novel biomarkers

- and drug development targets in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58:327–333.
15. Karnik KS, Samii VF, Weisbrode SW, London CA, Green EM. Accuracy of computed tomography in determining lesion size in canine appendicular osteosarcoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 2012;53:273–279.
 16. Glikin GC, Finocchiaro LME. Clinical trials of immunogene therapy for spontaneous tumors in companion animals. *ScientificWorldJournal*. 2014; 1-13.
 17. Nelson RW, Couto CG. Fundamentos de medicina interna de pequenos animais. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 737p.
 18. Neuwald EB, Veiga DC, Gomes C, Oliveira EC, Contesini EA. Osteossarcoma craniano em um cão. *ACTA SCI VET Journal*. 2006;34(2): 215-219.
 19. Schiffman JD, Breen M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2015;1-13.
 20. Brasileiro Filho G. Bogliolo Patologia Geral. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 1524p.
 21. Shringarpure SS, Kumar A, Shankar S, Menon M. A case of primary extraosseous penile osteosarcoma and review of the literature. *Indian journal of urology*. 2012;28, 102-104.
 22. Ettinger S, Feldman EC. Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 2236p.
 23. Angstadt AY, Motsinger-Reif A, Thomas R, William C, Kisseberth W C, Couto CG, Duval DL, Nielsen DM, Modiano JF, Breen M. Characterization of canine osteosarcoma by array comparative genomic hybridization and RT-qPCR: signatures of genomic imbalance in canine osteosarcoma parallel the human counterpart. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50:859–74.
 24. Schmidt AF, Nielen M, Klungel OH, Hoes AW, Boer A, Groenwolda RHH, Kirpensteijn J. Prognostic factors of early metastasis and mortality in dogs with appendicular osteosarcoma after receiving surgery: an individual patient data meta-analysis. *Prev Vet Med*. 2013;112:414–422.
 25. Sampson VB, Yoo B, Kumar A, Vetter NS, Kolb EA. MicroRNAs and potential targets in osteossarcoma: review. *Frontiers in pediatrics*. 2015;3:1-3.
 26. Broadhead ML, Clark JCM, Myers DE, Dass CR, Choong PFM. The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. Hindawi Publishing Corporation. 2011;2011:1-12.

27. Cotrans RS, Kumar V, Robbins ST. Robbins: Patologia estrutural e funcional. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 1250p.
28. Gardinali JB, Martelli A. Aspectos clínicos e fisiopatológicos de osteossarcoma em cães. *Science and Animal Health*. 2015;3(1):13-30.
29. Zachary JF, McGavin MD. Bases da patologia em veterinária. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. 1344p.
30. Hattinger CM, Fanelli M, Tavanti E, Vella S, Ferrari S, Picci P, Serra M. Advancer in emerging drugs for osteosarcoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2015;20(3):495-514.
31. Singh NP, Ferreira JFS, Park JS, Lai HC. Cytotoxicity of ethanolic extracts of *Artemisia annua* to molt-4 human leukemia cells. *Planta Med*. 2011;77:1788-1793.
32. Oliveira CB, Comunello LN, Maciel ES, Giubel SR, Bruno AN, Chiela ECF, Lenz G, Gnoatto SCB, Buffon A, Gosmann G. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in siha cells: differences in their activity and mechanism of action. *Molecules*. 2013;18:11022-11032.
33. Kwiecinski MR, Felipe KB, Schoenfelder T, Wiese LPL, Rossi MH, Goncalvez E, Felicio JD, Wilhelm Filho D, Pedrosa RC. . Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *J Ethnopharmacol*. 2008;117:69–75.
34. Felipe KB, Kwiecinski MR, Silva FO, Bückera NF, Farias MS, Castro LSEPW,
35. Grinevicius VMAS, Motta NS, Correia JFG, Rossi MH, Pedrosa RC. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *J Ethnopharmacol*. 2014;155:1492–1499.
36. Cunha BLA, França JP, Moraes AAFS, Chaves ALF, Gaiba S, Fontana R, Sacramento CK, Ferreira LM, França LP. Evaluation of antimicrobial and antitumoral activity of *Garcinia mangostana* L. (mangosteen) grown in Southeast Brazil. *Acta Cir. Bras*. 2014;29(2):1-28.
37. Rebouças SO, Grivicicha I, Santos MS, Rodriguez P, Gomes MD, Oliveira SQ, Silva J, Ferraza ABF. Antiproliferative effect of a traditional remedy, *Himatanthus articulatus* bark, on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2011;137:926-929.
38. Suffredini IB, Paciencia MLB, Varella AD, Younes RN. In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia*. 2007;78:223–226.
39. Ozi JM, Suffredini IB, Paciencia M, Frana AS, Dib LL. In vitro cytotoxic effects of Brazilian plant extracts on squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz Oral Res*. 2011;25(6):519-25.

40. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2007; 7(1):53-60.
41. Farias I, Araújo MC, Zimmermann ES, Dalmora SL, Benedetti AL, Silva MA, Asbahr ACC, Bertol G, Farias J, Schetinger MRC. *Uncaria tomentosa* stimulates the proliferation of myeloid progenitor cells. J Ethnopharmacol. 2011;137:856-863.
42. Roesler R, Lorencini M, Pastore G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2010;30(3):814-821.
43. Fitofisionomias bioma cerrado. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade [acesso 21 jan 2016]. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/projetojalapao/pt/biodiversidade-3/fitofisionomias.html>.
44. Coutinho LM. O conceito de bioma. Acta bot. bras. 2006;20(1):1-11.
45. Machado RB, Ramos Neto MB, Pereira PGP, Caldas EF, Gonçalves DA, Santos NS, Tabor K, Steininger M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília: 2204. 22p.
46. Carrazza LR, Avila JCC. Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto do Pequi (*Caryocar brasiliense*). 2a ed. Brasília: ISPN; 2010. 48p.
47. Carvalho PER: Árvore do conhecimento espécies arbóreas brasileiras: taxonomia e nomenclatura [Internet]. [acesso 21 jan 2016]. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000fyu2dm8202wx5ok083drx4ieh3njg.html.
48. Tatagiba F: Plantas do cerrado [Internet]. [acesso em 21 jan 2016]. Disponível em: <http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/pequi.html>.
49. Voltech JM. Estudo alelopático de plantas medicinais do cerrado. Anais.. Simpósio de plantas medicinais. Botucatu-SP, UNESP. P.17, 2009.
50. Ambrósio CLB, Campos FACS, FARO ZP. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. Rev. Nutr. 2006;19(2):233-243.
51. Alves AM, Fernandes DC, Sousa AGO, Naves RV, Naves MMV. Características físicas e nutricionais de pequis oriundos dos estados de Tocantins, Goiás e Minas Gerais. Braz. J. Food Technol. 2014;17(3):198-203.
52. Passos XS, Santos SC, Ferri PH, Fernandes OFL, Paula TF, Garcia ACF, Silva MRR. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35(6):623-7.

53. Khouri J, Resck IS, Poças-Fonseca M, Sousa TMM, Pereira LO, Oliveira ABB, Grisolia CK. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). *Genet Mol Biol*. 2007;30:442-8.
54. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.* 1999;12(2):123-30.
55. Donadio JL. Frutos exóticos brasileiros. 1ª ed. São Paulo: Funesp. 2000. 120p.
56. Germano JN, Silva RLA, Santos EM. Estudo etnobotânico das plantas medicinais do cerrado do estado de Mato Grosso. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2007;3:23-31.
57. Germano JN, Silva RLA, Santos EM. Levantamento populacional de plantas medicinais do cerrado do estado de Mato Grosso. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2008;4:38-44.
58. Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2013. 503p.
59. Qiagen. The Qiagen transfection resource book second edition. Apresenta informações técnicas sobre cultivo celular. [acesso 28 dez 2015]. http://download.bion.com.cn/upload/month_0810/20081030_a64bd0dc4471606e4fb1ezLLCwIq1AFc.attach.pdf
60. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *J. Mater. Res.* 2003;6:317-320.
61. Pithon MM, Santos RL, RuellasACO, Fidalgo TKS, Romanos MTV, Mendes GS. Citotoxicidade *in vitro* de elásticos ortodônticos: comparação entre duas metodologias. *Rev. Saúde. Com.* 2008;4(1):19-26.
62. Yu HY, Kim SOK, Jin CY, Kim GY, Kim WJ, Yoo YH, Choi YH. b-lapachone-induced apoptosis of human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K/Akt pathway. *Biomol Ther.* 2014;22(3):184-92.
63. Lima A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb) [Tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2008. [acesso 28 dez 2015]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-30042008-090010/pt-br.php>.
64. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
65. Curi R, Peres CM, Como cultivar células. 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. 283p.

66. Park EJ, Min KJ, Lee TJ, Yoo YH, Kim YS, Kwon TK. b-Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. *Cell Death and Disease*. 2014;5:1-10.
67. Cao L, Li LS, Spruell C, Xiao L, Chakrabarti G, Bey EA, Reinicke KE, Srougi MC, Moore Z, Dong Y, Vo P, Kabbani W, Bornmann, Yordy JS, Boothman DA. Tumor-selective, futile redox cycle-induced bystander effects elicited by NQO1 bioactivatable radiosensitizing drugs in triple-negative breast cancers. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;21(2):237-50.
68. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova*. 2005; 28(5) 892-6, 2005.
69. Liu B, Liu J, Chen J, Zhu D, Zhou H, Wang X. A study on anticancer activity of *Caulis spatholobi* extract on human osteosarcoma SAOS-2 cells. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med*. 2013;10(5):256-60.
70. Mans DRA, Rocha AB, Schwartzmann G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist*. 2000;5:185-198.