

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

**CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE GABIROBEIRA  
(*Campomanesia adamantium*) EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA *IN*  
*VITRO***

Nara Cristina Silva

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA

2018



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
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. Identificação do material bibliográfico:**     **Dissertação**     **Tese**

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

Nome completo do autor: Nara Cristina Silva

Título do trabalho: CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium*) EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA *IN VITRO*

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

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

*Nara Cristina Silva*

Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

*Eugênio Gonçalves de Araújo*

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo  
Patologia Animal/EVZ/UFG  
Mát. 6302307

Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 12 / 08 / 2018

<sup>1</sup> 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.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em setembro de 2017.

NARA CRISTINA SILVA

**CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE GABIROBEIRA  
(*Campomanesia adamantium*) EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA *IN*  
VITRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

**Área de Concentração:**

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

**Linha de Pesquisa:**

Patobiologia animal, experimental e comparada

**Orientador:**

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

**Comitê de Orientação:**

Profa. Dra. Vanessa de Sousa Cruz -  
EVZ/UFG

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno -  
EVZ/UFG

GOIÂNIA

2018

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

Silva, Nara Cristina  
CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE  
GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium*) EM CÉLULAS DE  
OSTEOSSARCOMA IN VITRO [manuscrito] / Nara Cristina Silva,  
Vanessa de Sousa Cruz, Eugênio Gonçalves de Araújo. - 2018.  
LII, 52 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo; co-orientadora Dra. Vanessa de Sousa Cruz; co-orientador Dr. Adilson Donizeti Damasceno .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, ,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2018.  
Bibliografia. Anexos.

Inclui fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. neoplasia óssea. 2. cultivo celular. 3. MG-63. 4. Extratos de plantas. 5. *Campomanesia adamantium*. I. de Sousa Cruz, Vanessa . II. Gonçalves de Araújo, Eugênio . III. Gonçalves de Araújo, Eugênio , orient. IV. de Sousa Cruz, Vanessa , co-orient. V. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **501** 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 **14h00 min** do dia **29/06/2018**, 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) **Nara Cristina Silva**, intitulada: **“Citotoxicidade de extrato das folhas de**  
7 **gabirobeira (*Campomanesia adamantium*) em células de osteossarcoma in vitro.**”, apresentado  
8 para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Cirurgia,**  
9 **Patologia animal e Clínica médica**, desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora,  
10 **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves Araújo**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato  
11 (a) **Nara Cristina Silva** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor  
12 Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a  
13 arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo  
14 igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu  
15 nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o  
16 (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

17 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves Araújo (Orientador) Aprovada  
18 Profa. Dra. Regiani Nascimento Gagno Pôrto Aprovada  
19 Profa. Dra. Ana Paula Iglesias Santin Aprovada

20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Nara Cristina Silva,**  
21 Habilitada [(**Habilitado(a) ou não Habilitado(a)**)] pelo(s) motivo(s) abaixo  
22 exposto(s):

23 A candidata apresentou seu trabalho no tempo regimental  
24 e respondeu de forma satisfatória os questionamentos da  
25 Banca Examinadora

26 \_\_\_\_\_  
27 \_\_\_\_\_  
28 \_\_\_\_\_  
29 \_\_\_\_\_  
30 \_\_\_\_\_  
31 \_\_\_\_\_  
32 \_\_\_\_\_  
33 \_\_\_\_\_

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

35

*Não se aplica*

36

37

38

39

40

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

43 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves Araújo

44 Profa. Dra. Regiani Nascimento Gagno Pôrto

45 Profa. Dra. Ana Paula Iglesias Santin

*Eugênio Gonçalves Araújo*  
*Regiani Nascimento Gagno Pôrto*  
*Ana Paula Iglesias Santin*

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria, e ao meu irmão, Yuri, que sempre me motivaram; à equipe do laboratório multiusuário de cultivo celular da EVZ-UFG, sem o auxílio deles seria impossível finalizar este projeto.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Programa de Pós-Graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade em participar do mesmo.

Ao corpo docente e aos funcionários, que foram os principais responsáveis pelo conhecimento adquirido e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, por me aceitar em sua equipe, pela paciência, ensinamentos e orientação na realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa de Sousa Cruz, pela coorientação, ensinamentos e amizade. Sua ajuda foi fundamental na conclusão deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luiza Francisca de Souza, pela contribuição na identificação da gabirobeira.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Arnhold, por sua contribuição na análise estatística deste projeto.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição ao trabalho.

À toda equipe do Laboratório Multiusuário, em especial ao Leandro Lopes Nepomuceno, a Nayane Peixoto Soares, a Vanessa de Souza Vieira e Gabriela Hadler Gabriel. Sem o apoio e a colaboração deles não seria possível a conclusão deste trabalho. Obrigada pelos momentos inesquecíveis de aprendizado e descontração. Espero que a conclusão desta etapa não seja uma despedida.

À minha família, em especial aos meus pais, Maria do Carmo Silva e José Batista da Silva, e ao meu irmão, Yuri Vinícius Silva, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos.

Aos meus primos, Kezzia Lucineide de Sousa e Rafael Cícero de Alencar Santana, por me ajudarem durante o experimento.

Ao CRMV-PR por permitir minha vinda à Goiânia para que pudesse concluir o mestrado.

Aos meus cachorros Boris, Mina e Mione, por serem meus melhores amigos.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste sonho.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”

Mahatma Gandhi

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	1
1. Osteossarcoma .....	1
1.1. Características Gerais .....	1
1.2. Osteossarcoma em outras espécies .....	3
1.3. Tratamento.....	5
1.4. Quimioterápicos .....	5
1.4.1. Cisplatina.....	6
1.4.2. Doxorrubicina.....	6
1.4.3. Ifosfamida.....	7
1.4.4. Metotrexato.....	8
2. Novos agentes terapêuticos .....	8
3. <i>Campomanesia adamantium</i> .....	9
3.1. Potencial terapêutico.....	10
REFERÊNCIAS .....	12
CAPÍTULO 2 - EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA GABIROBEIRA ( <i>Campomanesia adamantium</i> ) REDUZ A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> .....	18
RESUMO .....	18
ETHANOLIC EXTRACT OF GABIROBEIRA LEAVES ( <i>Campomanesia adamantium</i> ) REDUCES THE PROLIFERATION OF OSTEOSSARCOMA CELLS CULTIVATED IN VITRO .....	18
ABSTRACT .....	18
1. Introdução.....	19
2. Materiais e métodos.....	20
2.1. Material botânico e obtenção do extrato .....	20
2.2. Células e cultura .....	20
2.4. Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Tripan.....	21

2.5. Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio (MTT) .....	22
3. Resultados e Discussão.....	22
4. Conclusão .....	29
Referências .....	30
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	32
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG).....	33
ANEXO B - Soluções preparadas .....	37

**LISTA DE FIGURAS**

## CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - A) Gabirobeira (*Campomanesia adamantim*); B) Frutos da gabirobeira..... 10

## CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Representação gráfica da média dos valores tamanho das células (TC), obtidos por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán. As células de osteossarcoma foram submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto e acetato das folhas da *C. adamantium* nas concentrações 0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL durante 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada extrato.....25

FIGURA 2 - Representação gráfica da média dos valores da viabilidade celular (VC) obtidos por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán. As células de osteossarcoma foram submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto e acetato das folhas da *C. adamantium* nas concentrações 0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL durante 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada extrato.....26

FIGURA 3 - Representação gráfica da média dos valores da citotoxicidade celular (CT), obtidos por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán. As células de osteossarcoma foram submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto e acetato das folhas da *C. adamantium* nas concentrações 0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL durante 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada extrato...27

FIGURA 4 - Representação gráfica dos valores da concentração necessária para inibir 50% (IC<sub>50</sub> em µL/mL), calculado por meio do ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio (MTT). As células de osteossarcoma da linhagem MG-63 foram submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto e acetato das folhas da gabirobeira (*C. adamantium*) nas concentrações 0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL durante 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada extrato. ....28

**LISTA DE QUADROS**

## CAPÍTULO 1

- QUADRO 1 - Sistema de estadiamento *Enneking*. O osteossarcoma é classificado em estádios, IA, IB, IIA, IIB e III, conforme grau, extensão local e presença ou ausência de metástases. Os estágios I e II são subdivididos de acordo com a extensão do tumor em intracompartimental (A) e extracompartimental (B). O grau é classificado em baixo (G1), alto (G2); a extensão em intracompartimental (T1) e extracompartimental (T2); e por último, ausência (M0) e presença (M1) de metástases.....3
- QUADRO 2 - Sistema de estadiamento da *American Joint Commission on Cancer (AJCC)* do osteossarcoma. Os tumores são classificados em estádios (I, II, III e IV), grau (baixo e alto). Os estágios I e II são subdivididos de acordo com o tamanho do tumor: (A) menor que 8cm e (B) maior que 8cm. O estágio IV é subdividido conforme a localização da metástase: (A) no pulmão e (B) em outros órgãos. ....3

**LISTA DE TABELAS**

## CAPÍTULO 2

- TABELA 1 - Média dos parâmetros tamanho celular (TC), viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) para cada grupo de concentração (0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL) do extrato etanólico bruto das folhas da gabirobeira (EBFG) em relação ao tempo de exposição (24, 48 e 72 horas). Os dados foram calculados pelo teste estatístico *Scott Knott* a partir dos valores obtidos do equipamento contador automático de células *Luna Automated Cell Counter* da análise de VC pelo método de exclusão do Azul de Tripán. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata. .23
- TABELA 2 - Média dos parâmetros tamanho celular (TC), viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) para cada grupo de concentração (0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL) do extrato acetato das folhas da gabirobeira (EAFG) em relação ao tempo de exposição (24, 48 e 72 horas). Os dados foram calculados pelo teste estatístico *Scott Knott* a partir dos valores obtidos do equipamento contador automático de células *Luna Automated Cell Counter* da análise de VC pelo método de exclusão do Azul de Tripán Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata. ....24

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

AJCC	<i>America Joint Commission on Cancer</i>
ANT	Antraciclinas
BFA	Biópsia de fragmento com agulha
CDP	Cisplatina
CH	Cistite hemorrágica
CT	Citotoxicidade celular
DMEM	Meio Dulbecco modificado de Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOX	Doxorrubicina
EAAEG	Extrato etanólico acetato de etila das folhas da gabirobeira
EEBG	Extrato etanólico bruto das folhas da gabirobeira
G <sub>24</sub>	Grupo tratado por 24 horas
G <sub>48</sub>	Grupo tratado por 48 horas
G <sub>72</sub>	Grupo tratado por 72 horas
GSH	Glutathione
GC	Grupo controle
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory concentration</i>
IFO	Ifosfamida
MSTS	<i>Musculoskeletal Tumor Society</i>
MTT	Tetrazólio (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphenyl-2H-tetrazólio)
MTX	Metotrexato
OCT2	<i>Organic cation transportes</i>
OS	Osteossarcoma
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
RNA	Ácido ribonucleico
TC	Tamanho das células
VC	Viabilidade celular

## RESUMO

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno, altamente agressivo que possui prognóstico desfavorável. O tratamento de escolha é a intervenção cirúrgica associada à quimioterapia sistêmica. Entretanto, os quimioterápicos empregados atualmente possuem diversos efeitos adversos aos pacientes que limitam o seu uso. Assim, pesquisas que visam novas alternativas ao tratamento desse câncer são de suma importância. Com este estudo, objetivou-se avaliar, *in vitro*, o potencial citotóxico de extratos das folhas da gabirobeira em células de osteossarcoma. A partir das folhas dessa planta, foi extraído o extrato etanólico bruto e acetato de etila. As células foram cultivadas e tratadas com ambos os extratos em diferentes concentrações e tempos de exposição pré-determinados. Foi analisada a citotoxicidade celular por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán e calculado o IC<sub>50</sub> pelo método de redução dotetrazólio. O extrato bruto apresentou maior citotoxicidade em comparação com o acetato, sendo o melhor resultado no grupo tratado com 1,0µL/mL durante 48 horas. Ademais, o valor do IC<sub>50</sub> para o G<sub>48</sub> situa-se no intervalo sugerido como melhor citotoxicidade. Por fim, os extratos das folhas da gabirobeira apresentaram ação citotóxica nas células de osteossarcoma *in vitro*.

**Palavras - Chave:** neoplasia óssea, cultivo celular, MG-63.

## ABSTRACT

Osteosarcoma is a highly aggressive malignant bone tumor that has an unfavorable prognosis. The treatment of choice is surgical intervention associated with systemic chemotherapy. However, the chemotherapeutic agents currently employed have several adverse effects on patients that limit their use. Thus, research aimed at new alternatives to the treatment of this cancer is of paramount importance. This study aimed to evaluate, *in vitro*, the cytotoxic potential of extracts from leaves of gabirobeira in osteosarcoma cells. From the leaves of this plant, the crude ethanolic extract and ethyl acetate were extracted. The cells were cultured and treated with both extracts at different concentrations and at predetermined exposure times. Cell cytotoxicity was analyzed by the Tripan blue exclusion assay and the  $IC_{50}$  calculated by the tetrazolium reduction method. The crude extract presented higher cytotoxicity compared to acetate, and the best result was in the  $1.0\mu\text{L}/\text{mL}$  group treated for 48 hours. In addition, the  $IC_{50}$  value for  $G_{48}$  is within the range suggested as the best cytotoxicity. Finally, extracts of the leaves of the gabirobeira presented cytotoxic action in the cells of *in vitro* osteosarcoma

**Keywords:** bone neoplasms, cell culture, MG-63.

# CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

## 1. Osteossarcoma

### 1.1. Características Gerais

O osteossarcoma (OS) é o sarcoma ósseo mais diagnosticado em humanos<sup>1</sup>. Os sarcomas ósseos são representados, principalmente, pelo osteossarcoma, condrossarcoma e sarcoma de Ewing. São neoplasias raras, de origem mesenquimal e alta heterogeneidade histológica, molecular e genética. Apresentam alta morbidade e mortalidade<sup>2</sup>.

Apesar da baixa incidência dos sarcomas ósseos, 0,2% das neoplasias malignas, o OS é o tumor primário mais frequente, altamente agressivo, causando destruição local dos ossos e possui alto potencial de metástases, principalmente nos pulmões<sup>3,4</sup>. Aproximadamente 80% dos pacientes com metástases apresentam os pulmões acometidos, preferencialmente na sua periferia<sup>4</sup>.

A sua etiologia ainda é desconhecida, mas acredita-se que esteja relacionada com a rápida proliferação das células durante o período de crescimento tecidual<sup>4,5</sup>. Além disso, vários fatores podem contribuir para o seu surgimento, como idade, gênero, altura, raça e anormalidades congênitas<sup>6</sup>. Possui maior incidência em homens; pessoas mais altas; jovens (menores de 20 anos de idade) e idosos (acima de sessenta anos de idade)<sup>3,6,7</sup>.

Há a possibilidade de predisposição genética, como por exemplo nos pacientes com retinoblastoma hereditário, síndrome de Li-Fraumeni (mutação do gene p53) ou síndrome Rothmund-Thomson (mutação no gene RecQL4). Ademais, diversos fatores de risco podem favorecer o seu desenvolvimento, como a radiação ionizante e a Doença de Paget<sup>6</sup>.

Pode acometer tanto o esqueleto axial como o apendicular, sendo esse o mais diagnosticado, principalmente nas metáfises dos ossos longos<sup>8,9</sup>. A região de maior ocorrência é a articulação fêmoro-tibial, aproximadamente 50% dos pacientes, seguida da articulação úmero-radial<sup>3,4,9</sup>. O esqueleto axial representa, aproximadamente, 10% dos pacientes<sup>9</sup>. A ocorrência em ossos chatos, como escápula, pelve, coluna vertebral e crânio, aumenta com a idade e raramente ocorre nos ossos do pulso e tornozelo<sup>10</sup>.

Os principais sintomas são a dor e o inchaço. Entretanto, também pode ocorrer limitação da movimentação, devido a massa tumoral ou sinovite; hipertermia local; e fraturas patológicas<sup>4,8</sup>. Além de sintomas sistêmicos, como perda de peso, febre e fadiga<sup>8</sup>. Eventualmente a fratura patológica pode ser o primeiro sintoma da doença, particularmente em pacientes com tumores osteolíticos<sup>9</sup>.

O diagnóstico dessa neoplasia é realizado por meio da anamnese, exame físico e exames complementares, como análises laboratoriais e de imagem<sup>9</sup>. A análise histológica do material de biópsia fornece o diagnóstico definitivo, além de informações sobre o estadiamento do tumor<sup>11</sup>. A citologia pode ser realizada por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), biópsia de fragmento com agulha (BFA) ou por meio de incisão cirúrgica<sup>10</sup>.

Os marcadores bioquímicos, como a fosfatase alcalina sérica e o lactato desidrogenase, encontram-se em níveis elevados nos pacientes com OS. Essa alteração ocorre devido ao aumento da atividade osteoblástica. Assim, esses marcadores podem ser utilizados para a avaliação do prognóstico do paciente e para a monitoração do tratamento. Os níveis mais elevados estão associados com um prognóstico reservado e a persistência dessa elevação após o tratamento pode significar doença residual, reincidência ou presença de metástases<sup>10</sup>.

A radiografia é o exame de imagem mais utilizado para a avaliação de neoplasias ósseas primárias<sup>10,11</sup>. O OS pode apresentar aparência osteoblástica, osteolítica ou mista. Na radiografia simples, pode ser observado o triângulo de *Codman*, uma área triangular de calcificação decorrente do deslocamento do periósteo pela massa tumoral<sup>9,10</sup>. Ademais, também se observa lise óssea, aspecto de explosão solar (*sunburst*), destruição do córtex, formação óssea nos tecidos moles entre outras características<sup>10</sup>.

A ressonância magnética é usada para a averiguação da extensão do tumor, presença de massas de tecido mole, comprometimento medular e metástases<sup>10,11</sup>. É a ferramenta mais precisa para determinar os limites da massa tumoral, tanto superficial quanto central<sup>10</sup>. A tomografia computadorizada, por delinear a arquitetura óssea, é útil na avaliação da integridade cortical, ossificação, calcificação e fratura patológica<sup>10</sup>. Também é empregada para detecção de metástases pulmonares<sup>11</sup>. A tomografia por emissão de pósitrons tem se apresentado como um grande potencial na oncologia, pois pode ser utilizada tanto para a avaliação anatômica quanto funcional, metabólica ou bioquímica<sup>10</sup>.

O OS pode ser classificado, por meio de sistemas de estadiamento, conforme as suas características clínicas, radiológicas e histológicas. A classificação em maior grau indica uma maior agressividade. O estadiamento de uma neoplasia auxilia na determinação do seu tratamento, avaliação do prognóstico, monitoramento dos resultados terapêuticos, além de contribuir para a padronização na sua classificação<sup>12</sup>.

O sistema de estadiamento da Sociedade Americana Muscoesquelética, *Musculoskeletal Tumor Society* (MSTS), sistema de *Enneking* (Quadro 1), está fundamentado na classificação em estágios (IA, IB, IIA, IIB e III) a partir da avaliação do grau do tumor (G, G1, G2), da extensão local (T, T1, T2) e na presença (M1) ou ausência (M0) de metástases<sup>12</sup>.

QUADRO 1 - Sistema de estadiamento *Enneking*. O osteossarcoma é classificado em estádios, IA, IB, IIA, IIB e III, conforme grau, extensão local e presença ou ausência de metástases. Os estágios I e II são subdivididos de acordo com a extensão do tumor em intracompartimental (A) e extracompartimental (B). O grau é classificado em baixo (G1), alto (G2); a extensão em intracompartimental (T1) e extracompartimental (T2); e por último, ausência (M0) e presença (M1) de metástases.

<b>Estádio</b>	<b>Grau</b>	<b>Extensão</b>	<b>Metástase</b>
IA	G1	T1	M0
IB	G1	T2	M0
IIA	G2	T1	M0
IIB	G2	T2	M0
III	G1 ou G2	T1 ou T2	M1

Fonte: Adaptado de Jawad e Scully<sup>12</sup>

Já o sistema de estadiamento da *American Joint Commission on Cancer (AJCC)* é baseado no sistema TGNM, T (de tumor), G (de grau), N (de linfonodo), M (de metástases). Essa classificação está fundamentada no tamanho do tumor, comprometimento dos linfonodos e presença de metástases<sup>10</sup>, conforme Quadro 2.

QUADRO 2 - Sistema de estadiamento da *American Joint Commission on Cancer (AJCC)* do osteossarcoma. Os tumores são classificados em estádios (I, II, III e IV), grau (baixo e alto). Os estágios I e II são subdivididos de acordo com o tamanho do tumor: (A) menor que 8cm e (B) maior que 8cm. O estágio IV é subdividido conforme a localização da metástase: (A) no pulmão e (B) em outros órgãos.

<b>Estádio</b>	<b>Grau</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Metástases</b>
I-A	Baixo	< 8 cm	Ausente
I-B	Baixo	> 8 cm	Ausente
II-A	Alto	< 8 cm	Ausente
II-B	Alto	> 8 cm	Ausente
III	-	-	Lesões descontínuas no próprio osso
IV-A	-	-	Pulmonares
IV-B	-	-	Não pulmonares

Fonte: Adaptado de Kundu<sup>10</sup>

O prognóstico dessa neoplasia depende da resposta ao tratamento quimioterápico e do estado metastático durante o seu diagnóstico<sup>2</sup>. Apesar do aumento da taxa de sobrevivência, de cinco anos, para 60% a 70% dos pacientes ser decorrente do tratamento quimioterápico, essa taxa nos casos com metástases ou reincidências é de apenas 10% a 20%<sup>3</sup>.

## 1.2. Osteossarcoma em outras espécies

O OS também é o tumor ósseo mais diagnosticado em outras espécies, como cães e gatos. Em caninos compreende cerca de 80% das neoplasias ósseas malignas, enquanto nos

felinos domésticos aproximadamente 70%<sup>13,14</sup>. Entretanto, nos equinos e nos animais de produção, a sua incidência é rara<sup>13,15,16</sup>.

Nos cães a incidência dessa neoplasia é 27 vezes maior do que nos humanos. À semelhança do OS em humanos, o canino ocorre principalmente nas regiões metafisárias dos ossos longos, sendo relatado principalmente no esqueleto apendicular, cerca de 80% nos cães e 90% nos humanos<sup>7</sup>. Todavia, os membros anteriores dos cães, principalmente no rádio distal e úmero proximal, são mais afetados, aproximadamente duas vezes mais do que os posteriores; já nos humanos, o local de maior incidência é a articulação do joelho, particularmente no fêmur distal e tíbia proximal<sup>17</sup>. Outra semelhança entre ambas as espécies são os fatores de risco envolvidos, como sexo e crescimento, sendo mais relatado em machos e em raças de grande porte. Embora, nos cães possui caráter hereditário, com maior ocorrência em determinadas raças, como Rottweiler, Greyhound, Deerhound e Irish Wolfhound<sup>7,17</sup>.

Apesar das similaridades entre o OS canino e o humano, há características distintas entre ambos, como a idade. Enquanto os cães adultos a idosos são mais afetados, com mediana de oito anos de idade ao diagnóstico, em humanos OS é contraditoriamente mais relatado nos jovens. Porém, o OS canino possui um pequeno pico em animais jovens (menores que três anos) e em humanos possui um segundo pico de ocorrência em pacientes com idade superior a sessenta anos<sup>17,18</sup>.

Nos gatos, a idade média de ocorrência do OS é de dez anos e não há predisposição por raças ou sexo<sup>14,19</sup>. A incidência no esqueleto apendicular é semelhante ao axial, já o OS extraesquelético representa 40% dos casos<sup>19</sup>. Embora o OS felino apresente similaridade histológica com o humano e o canino, o seu comportamento difere desses, especialmente no potencial de metástases. Aproximadamente 80% a 90% dos pacientes caninos apresentam metástases, já os felinos, apenas 5% a 10% dos casos<sup>18-20</sup>. Ademais, a mediana de sobrevivência de gatos com OS após a remoção cirúrgica do osso acometido é de quatro anos, já para os cães é de três a quatro meses, e de um ano quando adicionado a quimioterapia adjuvante ao tratamento<sup>18</sup>.

Nos equinos, ao contrário dos humanos e dos pequenos animais, o OS possui maior incidência na cabeça do que no esqueleto apendicular, principalmente na mandíbula<sup>13,15,21</sup>. Apesar de ter sido descrito na escápula, úmero, rádio e tarso<sup>15,21</sup>. Sua etiologia também é desconhecida, contudo o trauma, a radiação, a infecção viral e alguns fatores genéticos têm sido considerados como fatores predisponentes<sup>13</sup>.

Nos bovinos, como nos equinos, o OS é mais diagnosticado no esqueleto axial, especialmente na região da cabeça, porém também há relatos no apendicular, como escápula,

ísquio e metacarpo<sup>16,22</sup>. O OS na mandíbula apresenta acentuado pleomorfismo e invasividade local, embora, sem presença de metástases<sup>16</sup>. Em contrapartida, foi relatado presença de metástases no OS no ísquio<sup>22</sup>. Acredita-se que a mandíbula é local de maior ocorrência do OS nos grandes animais devido aos traumas frequentes nesse local<sup>13</sup>.

Diante das semelhanças entre o OS humano e o canino, como locais mais afetados, predominância pelo sexo masculino, alto potencial de metástases, entre outros, esse é considerado como um modelo para estudo daquele<sup>18,23,24</sup>. Assim, vários estudos comparam o OS entre essas espécies, como por exemplo, o mesmo grupo de pesquisa envolvido neste experimento demonstrou o potencial citotóxico da *β lapachona* tanto na linhagem celular de OS de origem humana MG-63, quanto na linhagem canina D-17. Na MG-63, o grupo tratado por 72 horas (G<sub>72</sub>) com dosagem de 1,0μM apresentou menor viabilidade celular (VC) em relação as concentrações 0,1μM e 0,3μM. Já na D-17, a menor VC foi relatada no G<sub>72</sub> com concentração 0,3μM. As células da linhagem MG-63 apresentaram maiores necessidades metabólicas do que a D-17. Esse fato pode estar relacionado ao número de passagens daquelas células estarem acima de 100, o que sugere que aquelas células estão senescentes<sup>25,26</sup>.

### 1.3. Tratamento

Até os anos 70, o tratamento para o OS nos membros era somente a amputação. O seu prognóstico era desfavorável, sendo que apenas 10% a 25% dos casos com ausência de metástase sobreviviam após cinco anos decorridos da cirurgia<sup>27</sup>. Na década de 70, as drogas quimioterápicas, como doxorrubicina (DOX) e metotrexato (MTX), foram incluídas ao tratamento, melhorando a resposta ao mesmo<sup>28</sup>. Primeiramente, esses fármacos eram usados isoladamente; todavia, foi demonstrado que a combinação entre eles possibilitava índices de até 70% sem recidivas, assim, a associação passou a ser a terapia mais aplicada<sup>29,30</sup>. Atualmente, o tratamento é multidisciplinar, abrangendo a radioterapia, a intervenção cirúrgica, a quimioterapia, além da associação desses<sup>5,31</sup>. O protocolo quimioterápico mais utilizado consiste no uso da cisplatina (CPD), DOX, MTX e ifosfamida (IFO)<sup>32,33</sup>.

Ademais, em 35% a 45% dos pacientes com OS pode ocorrer resistência aos agentes quimioterápicos, intrínseca ou desenvolvida ao longo do tratamento<sup>34</sup>. Vários são os mecanismos dessa resistência, como a alteração da absorção e transporte da droga, desintoxicação celular, reparação dos danos ao DNA entre outros<sup>35</sup>.

### 1.4. Quimioterápicos

#### 1.4.1. Cisplatina

A CDP é um agente antineoplásico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, como o OS<sup>36,37</sup>. Apesar de ter sido relatada pela primeira vez em 1.844 por M. Peyrone, a sua atividade antitumoral foi descoberta na década de 60 por Rosenberg ao observar que produtos da eletrólise dos eletrodos de platina inibiam o crescimento de *Escherichia coli*<sup>37,38</sup>. A atividade antineoplásica da CDP resulta da sua interação com o DNA, o que resulta na formação de adutos CDP-DNA. Essa associação altera a estrutura conformacional do DNA, por conseguinte, afeta o seu processo de replicação e transcrição, inibe a sua síntese, altera o ciclo celular e induz à apoptose<sup>37,39</sup>.

O uso da CDP é limitado devido aos seus efeitos adversos, principalmente a nefrotoxicidade, e também devido à resistência das células neoplásicas<sup>36,37</sup>. Além da nefrotoxicidade, a CDP está relacionada à neurotoxicidade, ototoxicidade, reações alérgicas, distúrbios gastrointestinais<sup>37</sup>. O rim é o principal responsável pela sua excreção, como também é o local onde ocorre maior acúmulo do fármaco. A concentração nas células tubulares epiteliais é cinco vezes maior do que a concentração sérica, o que induz o estresse oxidativo, inflamação, isquemia, diminuição da taxa de filtração glomerular e consequentemente insuficiência renal aguda<sup>37,40</sup>. A nefrotoxicidade induzida pela CDP pode ser minimizada através do uso de diuréticos, como manitol e furosemida, como também por fitoquímicos, como 6-gingerol (composto do *Zingiber officinale*), cannabidiol (composto do *Cannabis sativa*)<sup>40</sup>.

A resistência à CDP é considerada multifatorial, tendo como exemplos de causas a redução de CDP no interior das células devido à perda de CTR1 (proteína transportadora de alta afinidade para o cobre -*copper transporter*), inativação da CDP ativa pela glutatona (GSH) ou metalotioneína presente no citoplasma, aumento do efluxo através dos transportadores de cobre (ATP7A e ATP7B), mecanismos de reparação do DNA<sup>36</sup>. Ela pode ser minimizada por meio de associação com outros fármacos ou de técnicas que melhoram a entrega da CDP ao DNA alvo, como a sua administração em polímeros ou lipossomos<sup>36,37</sup>. A sua combinação com produtos naturais, como *Sun-Bai Pi* (SBP), casca da raiz de *Morus alba L.*, tem demonstrado ser uma estratégia para contornar os efeitos adversos desse quimioterápico. A combinação da CDP com o extrato de SBP resulta em redução da viabilidade celular e aumento da morte celular por apoptose em relação ao uso isolado da CDP<sup>41</sup>.

#### 1.4.2. Doxorrubicina

A DOX é um dos quimioterápicos mais utilizados no tratamento contra o câncer. É um antibiótico glicosídico do grupo das antraciclina (ANT), originalmente isolado de culturas

de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*<sup>42,43</sup>. As primeiras drogas dessa classe foram desenvolvidas em 1960, resultando em avanço para o tratamento do câncer, uma vez que possibilitou o aumento da sobrevivência dos pacientes<sup>44,45</sup>.

A DOX ou adriamicina intercala-se entre os pares de bases do DNA, com isso inibe a síntese de DNA e RNA. Além de inibir a enzima topoisomerase II, induzir à apoptose e à formação de radicais livres que causam danos oxidativos às membranas celulares, proteínas e DNA<sup>42,46</sup>.

Apesar de ser um antineoplásico amplamente usado na quimioterapia devido à sua eficácia, o emprego da DOX é limitado devido aos seus efeitos adversos, como a cardiotoxicidade<sup>43</sup>. As alterações cardíacas são causadas por diversos fatores, como geração de espécies reativas de oxigênio, ruptura da homeostase férrica intracelular, formação de metabólitos de ANT, como álcoois secundários<sup>43</sup>. O miocárdio é mais susceptível às ANT devido ao seu elevado metabolismo oxidativo, reduzidas concentrações de superóxido dismutase e catalase nos cardiomiócitos e elevadas quantidades de mitocôndrias, onde se acumula a DOX e há posteriormente a formação de espécies reativas de oxigênio<sup>47</sup>. Os pacientes apresentam arritmias, miocardite, cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva. Estima-se que 11% dos pacientes são afetados pela forma aguda da cardiotoxicidade e 1,7% pela forma crônica<sup>43</sup>.

A fim de limitar a cardiotoxicidade induzida pela DOX, várias moléculas foram analisadas como adjuvantes cardioprotetores, como betabloqueadores, bloqueadores dos receptores da angiotensina, leucovorina e eritropoietina<sup>48</sup>. Ademais, diversos fitoquímicos também apresentam atividade cardioprotetora, como a berberina (derivado da *Berberis*), eugenol (derivado da *Syzygium aromaticum*), ácido arjunólico (derivado da *Terminalia arjuna*), cannabidiol (derivado da *Cannabis sativa*)<sup>48</sup>.

#### 1.4.3. Ifosfamida

A IFO é um pró-fármaco antineoplásico pertencente à classe oxazafosforina dos agentes alquilantes de DNA<sup>49,50</sup>. É usada em associação a outras drogas no tratamento de OS desde os anos 80<sup>51</sup>. Ela inibe a replicação do DNA e induz à apoptose devido a ativação de caspases<sup>52</sup>.

A IFO está associada à nefrotoxicidade, encefalopatias, cardiotoxicidade e cistite hemorrágica (CH)<sup>50,53</sup>. A CH está presente em aproximadamente 70% dos pacientes. Ocorre devido à redução de glutatona endógena e formação de radicais livres, o que provocam edema, úlceras, neovascularização, hemorragia e necrose na bexiga<sup>54</sup>. Como forma de minimizar a CH,

recomenda-se a hidratação e administração de antioxidantes, como amifostina, polissulfato de pentosano de sódio e Mesna<sup>54</sup>. A Mesna não possui efeito antineoplásico, mas a sua associação com a IFO deve ser considerada pelo fato de minimizar a CH<sup>53</sup>. Porém, 10% a 40% dos pacientes tratados com Mesna ainda desenvolvem CH. Por conseguinte, deve-se pesquisar novas alternativas para reduzir os efeitos adversos da IFO e otimizar a quimioterapia<sup>54</sup>.

#### 1.4.4. Metotrexato

O MTX é um antimetabólico antagonista do ácido fólico, essencial para a síntese de nucleotídeos purínicos, os quais são necessários para a síntese de DNA<sup>55-57</sup>. Os antagonistas do ácido fólico foram os primeiros antimetabólicos utilizados para fins terapêuticos e o MTX foi a primeira droga usada como monoterapia nos tratamentos contra o câncer<sup>57-59</sup>. Esses agentes inibem as vias metabólicas que necessitam de carbono fornecido pelo ácido fólico ou vitamina B<sub>9</sub><sup>57</sup> e possuem ação anti-inflamatória, antiproliferativa e imunossupressora, sendo usados no tratamento de diversas doenças, como a artrite reumática, psoríase e vários tipos de neoplasias<sup>56,58</sup>. O MTX inibe a produção de metabólitos essenciais para a síntese de nucleotídeos e, conseqüentemente, bloqueia a divisão na fase S do ciclo celular<sup>60</sup>.

Apesar da sua eficácia, o MTX está associado a efeitos adversos, como a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade pulmonar e mucosites<sup>58</sup>. O tipo de toxicidade está relacionada com a concentração e o tempo de exposição<sup>61</sup>. A nefrotoxicidade é causada pela precipitação da droga e seus metabólitos nos túbulos renais ou pelo efeito tóxico direto<sup>61</sup>. Ainda que sejam adotadas medidas preventivas como hidratação, alcalinização da urina e uso da leucovorina, 1,8% dos pacientes com OS apresentam disfunção renal, o que diminui a excreção do MTX, que ocorre principalmente por via renal, aumentando a sua concentração sérica e reduzindo o seu resgate pela leucovorina<sup>61</sup>.

## 2. Novos agentes terapêuticos

Diante do exposto, incluindo os efeitos adversos, a resistência e a alta toxicidade associados aos quimioterápicos, são necessárias novas estratégias e abordagens terapêuticas para o OS a fim de melhorar a sobrevivência dos pacientes<sup>62</sup>. Assim, a busca por novas alternativas terapêuticas, medicamentos com menos efeitos adversos e com maior eficiência, é de suma importância<sup>63</sup>.

Diversas pesquisas estudam o potencial terapêutico, incluindo o efeito antineoplásico, dos produtos naturais. Esses produtos, como as plantas, os organismos marinhos

e os microrganismos, são utilizados na terapia contra o câncer a mais de quarenta anos e as plantas têm sido uma importante fonte para novos antineoplásicos<sup>63,64</sup>. Estima-se que mais de 60% desses medicamentos sejam derivados de fontes naturais<sup>64</sup>; entre os 128 antineoplásicos liberados no mercado durante o período compreendido entre 1981 e 2010, 12 eram produtos naturais e 32 derivados de produtos naturais<sup>65</sup>. Ademais, desde 1961, aproximadamente nove antineoplásicos derivados de plantas foram aprovados nos EUA, como a vincristina e a vimblastina derivados da *Catharanthus roseus*; o etoposido e o teniposido derivados semissintéticos do metabólito podofilotoxina da *Podophyllum peltatum*<sup>63</sup>.

Dentre os estudos com as plantas, destacam-se os que pesquisam um possível potencial terapêutico nas plantas do cerrado brasileiro. Esse é o segundo maior bioma brasileiro, ocupa aproximadamente 23% do território nacional. Apresenta grande diversidade florística, considera-se que seja a savana tropical mais rica do mundo em termos de biodiversidade, além de possuir diversas espécies com potencial terapêutico, inclusive atividade antitumoral<sup>66,67</sup>.

Os frutos do cerrado, como pequi, baru, caigata, jenipapo, buriti, jabuticaba, são considerados uma fonte de substâncias bioativas, como compostos fenólicos. Esses compostos estão diretamente relacionados com a atividade terapêutica dessas plantas<sup>67</sup>. Ademais, foi constatado potencial antineoplásico em várias plantas desse bioma, como as das famílias *Annonaceae*, *Apocynaceae* e *Fabaceae*, cuja propriedade medicinal deve-se ao terpenos e compostos fenólicos<sup>66</sup>. Outras espécies também apresentam potencial antiproliferativo, como as plantas família *Myrtaceae*, incluindo a *Campomanesia adamantium*<sup>68</sup>.

### 3. *Campomanesia adamantium*

A *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae) é popularmente conhecida como guavira, gabiroba, guabiroba-do-campo, guabiroba-do-cerrado, guabiroba-lisa e guabiroba-branca<sup>68,69</sup>. Essa planta pertence à família *Myrtaceae* e a subfamília *Myrtoidea*. A família *Myrtaceae* possui aproximadamente 5.500 espécies, classificadas em 144 gêneros e 144 tribos. A tribo *Myrteae* é a mais diversificada, possui 2.500 espécies, incluindo a *C. adamantium*<sup>70</sup>.

A tribo *Myrteae* representa a família *Myrtaceae* nas regiões neotropicais. Entretanto, também é descrita no sudeste asiático, nordeste da Austrália e ilhas do Pacífico<sup>70</sup>. No Brasil, está presente no cerrado, região Centro-Oeste, e no Sudeste<sup>69,71</sup>.

A *C. Adamantium* é um arbusto (Figura 1-A), com até 2 m de altura, bastante ramificado e com ramos delgados, glandulares e glabros<sup>69,72</sup>. As folhas são opostas, elípticas a

abovadas, possuem superfície lisa e glabra, textura membranácea, base aguda a obtusa, margem sinuosa e ciliada<sup>72</sup>. Eles florescem entre setembro e novembro<sup>71</sup> e os pedúnculos são longos, glandulares, glabros e levemente achatados. Os botões florais são glabros, glandulares, abertos e possuem duas bractéolas na sua base e suas flores são brancas e solitárias, sendo uma flor por pedúnculo. Apresentam cálice com cinco sépalas unidas na base e corola com cinco pétalas. Os estames são de diversos tamanhos e pubescentes na base; as anteras basifixas e não possuem glândulas; o estilete é caduco; o estigma captado; o hipanto infundiliforme, glabro e glandular; e o ovário locular<sup>72</sup>.

Os frutos, Figura 1-B, amadurecem de novembro a dezembro, são redondos, verde-amarelados, suculentos e possuem aroma cítrico<sup>69,71,72</sup>. São comestíveis “*in natura*” e usados na fabricação de sucos, licores, doces<sup>65,71</sup>. Na indústria de bebidas, são utilizados como flavorizantes devido as suas características e constituintes, como, acidez acentuada, minerais, ácido ascórbico, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos<sup>71</sup>.

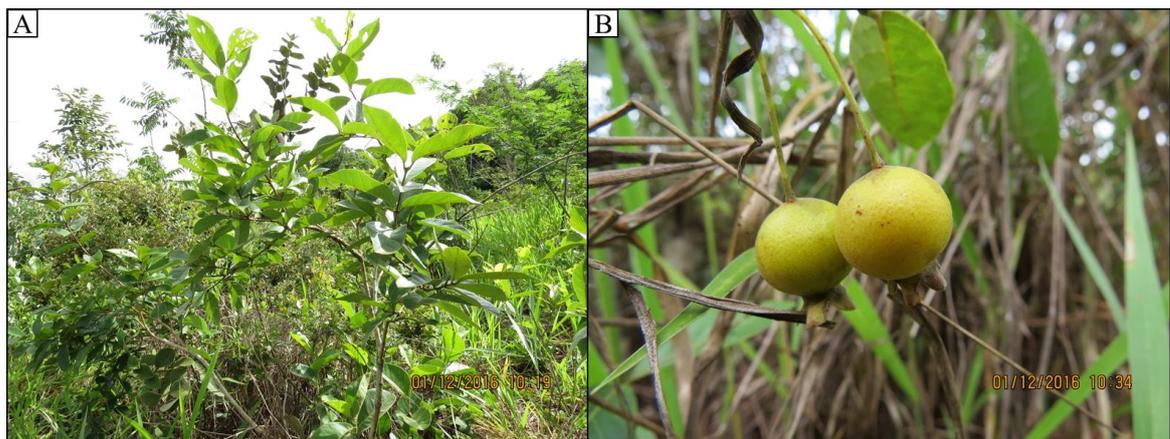


FIGURA 1 - A) Gabirobeira (*Campomanesia adamantium*); B) Frutos da gabirobeira.

Fonte: Arquivo Pessoal

### 3.1. Potencial terapêutico

Na medicina popular, diferentes partes *C. adamantium* são utilizadas no tratamento de diversas doenças. As folhas e os frutos são usados como antiinflamatórios, antidiarreicos, antigripal, anti-reumático e em infecções urinárias<sup>68,69,73</sup>. Já as raízes, são usadas no tratamento de diabetes<sup>68</sup>. Ademais, também são empregadas na redução do colesterol<sup>65</sup>.

Em estudos com essa planta, foram encontradas substâncias com atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antinociceptiva<sup>73</sup>. Foram identificados compostos fenólicos em seus frutos e folhas<sup>74,75</sup>. Em suas folhas, foram identificados flavonóides, como flavanonas, chalconas, miricitrina, quercetina e rutina<sup>75,76</sup>. Além disso, foi sugerido que esses compostos são

os principais constituintes das folhas da gabirobeira<sup>77</sup>. Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas e são encontrados em frutas, vegetais, casca, grãos, flores, raízes, caules. Diversas pesquisas estudam o potencial antineoplásico desses compostos<sup>78</sup>.

As atividades antiinflamatória e antinociceptiva foram demonstradas, em camundongos, a partir da polpa microencapsulada por meio de secagem por pulverização<sup>73</sup>. Como também nos extratos de acetato de etila e aquoso das suas folhas<sup>79</sup>, além dos óleos essenciais da semente e casca do fruto<sup>80</sup>.

O fruto da gabiroba também apresentou potencial hepatoprotetor devido aos seus compostos antioxidantes, como os flavonóides<sup>74</sup>. O extrato aquoso da sua raíz apresentou redução dos níveis séricos de colesterol total e triglicérides, além de propriedade antioxidante<sup>81</sup>.

Ainda, o seu potencial antiproliferativo foi demonstrado em estudos com linhagens celulares de câncer de próstata<sup>65</sup> e leucemia<sup>68</sup>. Foi relatado que a chalcona cardamonina, isolada do extrato etanólico das folhas, apresentou atividade antiproliferativa em células de câncer de próstata da linhagem celular PC-3<sup>65</sup>. O extrato aquoso das folhas e das raízes apresentaram atividade antileucêmica pela via apoptótica intrínseca. Foi identificado, principalmente, flavonóides glicosilados no extrato das folhas e ácido elágico, um polifenol, e seus derivados no extrato da raíz<sup>68</sup>.

Considerando-se a relevância do OS e a necessidade de novas terapias para a doença, objetivou-se, com este estudo, verificar os efeitos citotóxicos do extrato etanólico bruto e acetato de etila das folhas da gabiroba (*Campomanesia adamantium*) nas células de osteossarcoma *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

1. Yang JZ, Ma SR, Rong XL, Zhu MJ, Ji QY, Meng LJ, Gao YY, Yang YD, Wang Y. Characterization of multidrugresistant osteosarcoma sublines and the molecular mechanisms of resistance. *Mol Med Rep.* 2016;14(4):3269-76.
2. Brown HK, Schiavone K, Gouin F, Heymann M-F, Heymann D. Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. *Calcif Tissue Int.* 2017;102(2):174-95
3. Xie D, Zheng GZ, Xie P, Zhang QH, Lin FX, Chang B, Hu QX, Du SX, Li XD. Antitumor activity of resveratrol against human osteosarcoma cells: A key role of Cx43 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncotarget.* 2017;8(67):111419-32.
4. Evola FR, Costarella L, Pavone V, Caff G, Cannavò L, Sessa A, Avondo S, Sessa G. Biomarkers of Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Ewing Sarcoma. *Front in Pharmacol.* 2017;8:150..
5. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. WHO classification of bone tumours. In: Dorfman HD, Czerniak B, Vanel D, Park YK, Kotz R, Unni KK. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Lyon, France; 2002. 225-32.
6. Yang Y, Han L, He Z, Li X, Yang S, Yang J, Zhang Y, Li D, Yang Y, Yang Z. Advances in Limb Salvage Treatment of Osteosarcoma. *J Bone Oncol.* 2017;10:36-40.
7. Simpson S, Dunning MD, de Brot S, Grau-Roma L, Mongan NP, Rutland CS. Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Vet Scand.* 2017;59(1):71.
8. Rosenberg AE. Bone Sarcoma Pathology: Diagnostic Approach for Optimal Therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2017;37:794-8.
9. Ritter J, Bielack SS. Osteosarcoma. *Annals of Oncology.* 2010;21(suppl\_7):vii320-vii5.
10. Kundu ZS. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian Journal of Orthopaedics.* 2014;48(3):238-46.
11. Raimondi L, De Luca A, Costa V, Amodio N, Carina V, Bellavia D, Tassone P, Pagani S, Fini M, Alessandro R, Giavaresi G. Circulating biomarkers in osteosarcoma: new translational tools for diagnosis and treatment. *Oncotarget.* 2017;8(59):100831-51
12. Jawad MU, Scully SP. In Brief: Classifications in Brief: Enneking Classification: Benign and Malignant Tumors of the Musculoskeletal System. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2010;468(7):2000-2.
13. Bush JM, Fredrickson RL, Ehrhart EJ. Equine osteosarcoma: a series of 8 cases. *Vet Pathol.* 2007;44(2):247-9.
14. Al Sayed R AI Attar, Kubba MA, Seham AAIA, Adwak AA. chondroblastic-osteosarcoma-in-a-cat-case-report. *J Med Surg Pathol.* 2016;1:4..

15. Koch E, Pack L, Zwicker LA, Lopez-Mendez C, Aburto EM. Osteosarcoma in the proximal humerus of a mare. *Equine Veterinary Education*. 2014;26(8):410-5.
16. Peixoto T, Silva DN, Araújo BR, De Farias SS, Pinto MPR, Requião LGT, Muramoto C, Madureira KM. Mandibular chondroblastic osteosarcoma in a bovine - Case report. 2016. 60-4.
17. Varshney J, Scott MC, Largaespada DA, Subramanian S. Understanding the Osteosarcoma Pathobiology: A Comparative Oncology Approach. *Veterinary Sciences*. 2016;3(1):3.
18. Meyer FRL, Walter I. Establishment and Characterization of New Canine and Feline Osteosarcoma Primary Cell Lines. *Veterinary Sciences*. 2016;3(2):9.
19. Dimopoulou M, Kirpensteijn J, Moens H, Kik M. Histologic prognosticators in feline osteosarcoma: a comparison with phenotypically similar canine osteosarcoma. *Vet Surg*. 2008;37(5):466-71.
20. Wolfesberger B, Fuchs-Baumgartinger A, Hlavaty J, Meyer FR, Hofer M, Steinborn R, Gebhard C, Walter I. Stem cell growth factor receptor in canine vs. feline osteosarcomas. *Oncol Lett*. 2016;12(4):2485-92.
21. Cousty M, Tricaud C. Resection of a premaxilla and rostral portion of the maxilla in a horse. *Equine Veterinary Education*. 2012;26(5):269-73.
22. Nagamine E, Matsuda K, Ishii C, Koiwa M, Taniyama H. Primary Ischial Osteosarcoma Occupying the Pelvic Cavity in a Japanese Black Cow. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2014;76(6):891-4.
23. Guijarro MV, Ghivizzani SC, Gibbs CP. Animal Models in Osteosarcoma. *Frontiers in Oncology*. 2014;4:189.
24. Fan TM. Animal models of osteosarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2010;10(8):1327-38.
25. Gabriel GH. Propriedades citotóxicas da Beta-Lapachona em células de osteossarcoma in vitro. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2017..
26. Pimenta VdSC. Propriedades citotóxicas daβ lapachona em células de osteossarcoma canino in vitro. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2015.
27. Ta HT, Dass CR, Choong PFM, Dunstan DE. Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2009;28(1):247-63.
28. Rosen G, Suwansirikul S, Kwon C, Tan C, Wu SJ, Beattie EJ Jr, Murphy ML. High-dose methotrexate with citrovorum factor rescue and adriamycin in childhood osteogenic sarcoma. *Cancer*. 1974;33(4):1151-63..
29. Carrle D, Bielack SS. Current strategies of chemotherapy in osteosarcoma. *Int Orthop*. 2006;30(6):445-51.

30. Ferrari S, Ruggieri P, Cefalo G, Tamburini A, Capanna R, Fagioli F, Comandone A, Bertulli R, Bisogno G, Palmerini E, Alberghini M, Linari A, Picci P, Bacci G. Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, and doxorubicin with or without ifosfamide in nonmetastatic osteosarcoma of the extremity: an Italian sarcoma group trial ISG/OS-1. *J Clin Oncol.* 2012;30(17):2112-8.
31. Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res.* 2007;27(1a):155-64.
32. Mercatelli D, Bortolotti M, Bazzocchi A, Bolognesi A, Polito L. Immunoconjugates for Osteosarcoma Therapy: Preclinical Experiences and Future Perspectives. *Biomedicines.* 2018;6(1):19.
33. Harrison DJ, Schwartz CL. Osteogenic Sarcoma: Systemic Chemotherapy Options for Localized Disease. *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18(4):24.
34. Luetke A, Meyers PA, Lewis I, Juergens H. Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treatment Reviews.* 2014;40(4):523-32.
35. Li S, Sun W, Wang H, Zuo D, Hua Y, Cai Z. Research progress on the multidrug resistance mechanisms of osteosarcoma chemotherapy and reversal. *Tumor Biology.* 2015;36(3):1329-38.
36. Achkar IW, Abdulrahman N, Al-Sulaiti H, Joseph JM, Uddin S, Mraiche F. Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Translational Medicine.* 2018;16:96.
37. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
38. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 1965;205:698-9.
39. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;7(1):3-18.
40. Ojha S, Venkataraman B, Kurdi A, Mahgoub E, Sadek B, Rajesh M. Plant-Derived Agents for Counteracting Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016;2016:4320374.
41. Tseng CY, Lin CH, Wu LY, Wang JS, Chung MC, Chang JF, Chao MW. Potential Combinational Anti-Cancer Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer with Traditional Chinese Medicine Sun-Bai-Pi Extract and Cisplatin. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155469.
42. Karpinski TM, Adamczak A. Anticancer Activity of Bacterial Proteins and Peptides. *Pharmaceutics.* 2018;10(2).
43. Piska K, Koczurkiewicz P, Bucki A, Wojcik-Pszczola K, Kolaczkowski M, Pekala E. Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines - role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Invest New Drugs.* 2017;35(3):375-85.

44. Weiss RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol.* 1992;19(6):670-86.
45. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004;56(2):185-229.
46. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21(7):440-6.
47. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 2009;61(1):154-71.
48. Ojha S, Al Tae H, Goyal S, Mahajan UB, Patil CR, Arya DS, Rajesh M. Cardioprotective Potentials of Plant-Derived Small Molecules against Doxorubicin Associated Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:5724973.
49. Chen B, Yang JZ, Wang LF, Zhang YJ, Lin XJ. Ifosfamide-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA-dextran polymeric nanoparticles to improve the antitumor efficacy in Osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2015;15:752.
50. Lowenberg D, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: ifosfamide pathways, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 2014;24(2):133-8.
51. Fan XL, Cai GP, Zhu LL, Ding GM. Efficacy and safety of ifosfamide-based chemotherapy for osteosarcoma: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:5925-32.
52. Chugh R, Wagner T, Griffith KA, Taylor JM, Thomas DG, Worden FP, Leu KM, Zalupski MM, Baker LH. Assessment of ifosfamide pharmacokinetics, toxicity, and relation to CYP3A4 activity as measured by the erythromycin breath test in patients with sarcoma. *Cancer.* 2007;109(11):2315-22.
53. Bogiatzi S, Pagonopoulou O, Simopoulou M, Kareli D, Kouskoukis A, Koutka Z, Ipsilantis P, Lialiaris T. The cytogenetic action of ifosfamide, mesna, and their combination on peripheral rabbit lymphocytes: an in vivo/in vitro cytogenetic study. *Cytotechnology.* 2014;66(5):753-60..
54. Ali SA, Danda SK, Basha SAA, Rasheed A, Ahmed O, Ahmed MM. Comparison of uroprotective activity of reduced glutathione with Mesna in Ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *Indian Journal of Pharmacology.* 2014;46(1):105-8.
55. Puig L. Metotrexato: novedades terapéuticas. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* 2014;105(6):583-9.
56. Carretero G, Puig L, Dehesa L, Carrascosa JM, Ribera M, Sánchez-Regaña M, Moreno JC. Metotrexato: guía de uso en psoriasis. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* 2010;101(7):600-13..

57. Visentin M, Zhao R, Goldman ID. The Antifolates. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2012;26(3):629-48.
58. Leveque D, Santucci R, Gourieux B, Herbrecht R. Pharmacokinetic drug-drug interactions with methotrexate in oncology. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2011;4:743+.
59. LaCasce AS, Maki R, Freedman AS, Pappo AS, Savarese DM. Therapeutic use and toxicity of high-dose methotrexate. 2013.
60. Wood GS, Wu J. Methotrexate and Pralatrexate. *Dermatologic Clinics*. 2015;33(4):747-55.
61. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*. 2006;11(6):694-703.
62. Hattinger CM, Pasello M, Ferrari S, Picci P, Serra M. Emerging drugs for high-grade osteosarcoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2010;15(4):615-34.
63. Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial biotechnology*. 2011;4(6):687-99.
64. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;100(1):72-9.
65. Pascoal AC, Ehrenfried CA, Lopez BG, de Araujo TM, Pascoal VD, Gilioli R, Anhê GF, Ruiz AL, Carvalho JE, Stefanello ME, Slavador MJ. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules*. 2014;19(2):1843-55.
66. Oliveira TM, Martins CdM. Plantas medicinais do cerrado: uma revisão sobre atividade antitumoral. VI Congresso Estadual de Iniciação Científica e Tecnológica do IF Goiano; 2017; Campus Urutaí, Brasil.
67. Bailão EFLC, Devilla IA, da Conceição EC, Borges LL. Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(10):23760-83.
68. Campos JF, Espindola PPdT, Torquato HFV, Vital WD, Justo GZ, Silva DB, Carollo CA, Picoli SKd, Paredes-Gamero EJ, Santos ELd. Leaf and Root Extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:466
69. Vieira MC, Perez VB, Heredia ZNA, Santos MC, Pelloso IAO, Pessoa SM. Nitrogênio e fósforo no desenvolvimento inicial da guavira [*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg] cultivada em vasos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2011;13:542-9.
70. Vasconcelos TNC, Proença CEB, Ahmad B, Aguilar DS, Aguilar R, Amorim BS, Campbell K, Costa IR, De-Carvalho PS, Faria JEQ, Giaretta A, Kooij PW, Lima DF, Mazine FF, Peguero B, Prenner G, Santos MF, Soewarto J, Wingler A, Lucas EJ.

- Myrteae phylogeny, calibration, biogeography and diversification patterns: Increased understanding in the most species rich tribe of Myrtaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2017;109:113-37.
71. Vallilo MI, Lamardo LCA, Gaberlotti ML, Oliveira Ed, Moreno PRH. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. *Food Science and Technology*. 2006;26:805-10.
  72. Amaral EVEDJ, Reis EFd, Ressel K, Pinto J, Naves F. Descrição morfológica de duas espécies de *Campomanesia* RUIZ & PAVON (MYRTACEAE). *Revista Agrotecnologia*. 2016;7(1):42-52.
  73. Viscardi DZ, Oliveira VSd, Arrigo JdS, Piccinelli AC, Cardoso CAL, Maldonade IR, Kassuya CAL, Sanjinez-Argandoña AJ. Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2017;27(2):220-7.
  74. de Oliveira Fernandes T, de Ávila RI, de Moura SS, de Almeida Ribeiro G, Naves MMV, Valadares MC. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Toxicology Reports*. 2015;2:184-93.
  75. Coutinho ID, Coelho RG, Kataoka VMF, Honda NK, Silva JRM, Vilegas W, Cardoso CAL. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. *Eclética Química*. 2008;33:53-60.
  76. Fernando R. Pavan CQFL, Roberta G. Coelho, Isabel D. Coutinho, Neli K. Honda, Claudia A. L. Cardoso, Wagner Vilegas, Sergio R. de A. Leite e Daisy N. Sato. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of. *Quimica Nova*. 2016;32(5):1222-6.
  77. Pascoal AC, Ehrenfried CA, Eberline MN, Stefanello ME, Salvador MJ. Free radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-DAD/ESI-MS profile of *Campomanesia adamantium* leaves. *Nat Prod Commun*. 2011;6(7):969-72.
  78. Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*. 2013;3(6):439-59.
  79. Ferreira LC, Grabe-Guimarães A, de Paula CA, Michel MCP, Guimarães RG, Rezende SA, Souza JDdF, Saúde-Guimarães DA. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;145(1):100-8.
  80. Zuntini Viscardi D, Arrigo JdS, Correia CdAC, Kassuya CAL, Cardoso CAL, Maldonade IR, Argadoña EJ. Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. *PLoS ONE*. 2017;12(2):e0157107
  81. Espindola PPdT, da Rocha PdS, Carollo CA, Schmitz WO, Pereira ZV, Vieira MdC, Santos ALd, Souza KdP. Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:7910340.

## **CAPÍTULO 2 - EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium*) REDUZ A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CULTIVADAS *IN VITRO***

### **RESUMO**

O osteossarcoma é a neoplasia óssea maligna mais diagnosticada em humanos, com maior incidência em crianças e jovens. É altamente agressivo e possui elevado potencial de metástases. O seu tratamento baseia-se na associação entre quimioterapia e intervenção cirúrgica. Entretanto, os quimioterápicos utilizados atualmente, como a doxorrubicina, apresentam diversos efeitos adversos ao paciente. Diante disso, há uma demanda crescente por novos quimioterápicos que impulsionem novas pesquisas, como as que envolvem os compostos extraídos de plantas, tais como a gabirobeira. Por meio deste estudo, objetivou-se averiguar, *in vitro*, os efeitos citotóxicos do extrato etanólico, tanto o bruto como o acetato de etila, das folhas da gabirobeira em células de osteossarcoma. A citotoxicidade foi analisada pelo método de exclusão do azul de Tripán e o IC<sub>50</sub> calculado pelo método de redução do tetrazólio. O extrato etanólico das folhas da gabirobeira apresentou ação citotóxica nas células de osteossarcoma *in vitro*. O grupo tratado com o extrato bruto com 1,0µL/mL durante 48 horas apresentou maior citotoxicidade e o menor valor de IC<sub>50</sub> para esse extrato foi encontrado no intervalo de 24 a 48 horas.

**Palavras-chave:** Extratos de plantas, tumor, *Campomanesia adamantium*.

### **ETHANOLIC EXTRACT OF GABIROBEIRA LEAVES (*Campomanesia adamantium*) REDUCES THE PROLIFERATION OF OSTEOSARCOMA CELLS CULTIVATED IN VITRO**

### **ABSTRACT**

Osteosarcoma is the most diagnosed malignant bone neoplasm in humans, with greater incidence in children and young people. It is highly aggressive and has a high potential for metastases. Its treatment is based on the association between chemotherapy and surgical intervention. However, chemotherapy currently used, such as doxorubicin, has several adverse effects on the patient. Faced with this, there is a growing demand for new chemotherapeutics that drive new research, such as those involving compounds extracted from plants, such as gabirobeira. The aim of this study was to investigate *in vitro* the cytotoxic effects of the ethanolic extract, both crude and ethyl acetate, from the leaves of gabirobeira on osteosarcoma cells. Cytotoxicity was analyzed by the Tripán blue exclusion method and the IC<sub>50</sub> calculated by the tetrazolol reduction method. The ethanolic extract from the leaves of gabirobeira presented cytotoxic action in the cells of osteosarcoma *in vitro*. The group treated with the crude extract with 1.0µL/mL during 48 hours had a higher cytotoxicity and the lowest IC<sub>50</sub> value for this extract was found in the range of 24 to 48 hours.

**Key words:** Plant extracts, tumor, *Campomanesia adamantium*.

## 1. Introdução

O osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo maligno, de origem mesenquimal, altamente agressivo, com alta morbidade e mortalidade. Além disso, apresenta elevado potencial de metástases, principalmente nos pulmões<sup>1-4</sup>.

O diagnóstico é baseado no histórico clínico, exames físicos laboratoriais e complementares, como a radiografia e histopatologia<sup>5</sup>. O tratamento, geralmente, é multimodal, inclui quimioterapia sistêmica e cirurgia<sup>6</sup>. Os quimioterápicos mais utilizadas são cisplatina (CDP), doxorrubicina (DOX), metotrexato (MTX) e ifosfamida (IFO), tanto como terapia neoadjuvante (pré-operatório) quanto na fase adjuvante (pós-operatório)<sup>6,7</sup>. Apesar de serem importantes para o tratamento do paciente, esses fármacos podem ocasionar efeitos adversos a curto e a longo prazo, como náuseas, vômito, alopecia, mucosite, nefrotoxicidade, entre outros<sup>7</sup>. Ademais, o seu prognóstico é reservado para os pacientes com metástases. As taxas de sobrevivência em cinco anos após o diagnóstico de OS para os pacientes com metástases é de apenas 10% a 30%, sendo que para os pacientes sem metástases é de 60% a 70%<sup>6</sup>.

A incidência de reações adversas justifica a busca por novos agentes antineoplásicos. Nos últimos anos, houve um crescimento no número de pesquisas para a descoberta de novos quimioterápicos, utilizando-se, muitas vezes, plantas e outras fontes encontradas na natureza<sup>8</sup>. O cerrado brasileiro é considerado como uma fonte de recursos biológicos<sup>9</sup>. Sua flora é rica em espécies frutíferas que apresentam grande potencial terapêutico, como a *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, conhecida popularmente como guabiroba, guavira, guariroba, guabiroba-do-campo, guabiroba-do-cerrado, guabiroba-lisa<sup>10,11</sup>.

A *C. adamantium* é um arbusto, com ramos delgados e bastante ramificados, medindo até 2 m de altura<sup>12,13</sup>. Suas folhas são simples, opostas, ovais ou elípticas; florescem de setembro a novembro e possuem flores brancas e solitárias<sup>13,14</sup>. Os frutos amadurecem de novembro a dezembro, são redondos, de cor verde escuro à claro e amarelo<sup>12-14</sup>. São comestíveis tanto pelos animais quanto pela população local, além de serem utilizados na fabricação de produtos alimentícios, como sucos, doces, licores e geleias<sup>11,14</sup>.

Na medicina popular, essa planta é usada como antidiarreica, antimicrobiana, antioxidante, anti-reumática, antitumoral, assim como em infecções do trato urogenital, redução dos níveis de colesterol e tratamento de diabetes<sup>10-12,15,16</sup>. Estudos já demonstraram a sua atividade antimicrobiana, antiproliferativa, antiinflamatória e antinociceptiva<sup>10,11,15,17,18</sup>; além do potencial citotóxico do extrato das suas folhas<sup>10,11</sup>. Foi relatado que a chalcona cardamonina,

isolada do extrato etanólico das suas folhas, apresenta atividade antiproliferativa em células de câncer de próstata da linhagem celular PC-3<sup>11</sup>.

A fim de identificar compostos com provável potencial antineoplásico e, porventura, demonstrar uma possível alternativa aos tratamentos quimioterápicos atualmente utilizados, objetivou-se, por meio deste estudo, aferir os efeitos citotóxicos do extrato etanólico bruto e do extrato acetato de etila das folhas da gabirobeira em células de OS cultivadas *in vitro*.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Material botânico e obtenção do extrato

O extrato etanólico bruto das folhas da gabirobeira (EBFG) foi obtido a partir de folhas secas e fragmentadas da *C. adamantium*, por meio do método de extração por maceração. O material botânico, folhas da gabirobeira, foi colhido no Campus de Jataí da Universidade Federal de Goiás (UFG) (S 16° 17' 26.6", W 048° 57' 21.1") e identificado pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luiza Francisca de Souza.

As folhas foram lavadas e secas em estufa a 35°C por sete dias, a fim de eliminar a umidade e estabilizar o conteúdo enzimático. Posteriormente, foram trituradas em moinho elétrico de facas. A extração do extrato ocorreu por meio da maceração do material vegetal em álcool absoluto, na proporção de 2.200mL de álcool/480g de pó, durante 72 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi filtrado e concentrado em rota-vapor (Modelo Ika-Werk) a uma temperatura constante de 45 °C.

Para a obtenção do extrato acetato de etila (EAFG) a partir do extrato bruto, esse foi submetido ao processo de partição sólido-líquido. O extrato foi transformado em pastilha, após ser colocado em sílica-gel. Essa foi colocada em coluna cromatográfica e adicionado acetato até o ponto de saturação a fim de obter a fração de acetato de etila.

### 2.2. Células e cultura

Primeiramente, o projeto foi submetido à avaliação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG).

As células de OS (MG-63, BCRJ 0173, Lote 000888, Passagem 104), originárias da ATCC (*American Type Culture Collection* – Manassas, VA, USA), foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ – Rio de Janeiro, Brasil). Elas foram mantidas em incubadora umidificada à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O seu cultivo, em garrafas, foi realizado em meio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) acrescido de 20% de

soro fetal bovino, anfotericina B e L glutamina (todos provenientes da Cultilab, Campinas, Brasil) de acordo com o método de Yu et al<sup>19</sup>.

### 2.3. Delineamento experimental

Após a etapa de cultivo, as células foram quantificadas na câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços contendo 100µL de meio DMEM, nas concentrações de  $5 \times 10^4$  e  $1 \times 10^4$ , respectivamente, para a avaliação da viabilidade celular (VC) pelo método de exclusão do azul de Tripán e para o ensaio da VC pelo método de redução do tetrazólio [MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphnyl-2H-tetrazólio)]. A placa foi mantida em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas.

Em seguida, o meio foi desprezado e os poços tratados ou não com o extrato das folhas da gabirobeira (EBFG e EAFG), por 24 (G<sub>24</sub>), 48 (G<sub>48</sub>) e 72 horas (G<sub>72</sub>), nas concentrações de 0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL. Além do grupo controle (GC) negativo, tratado unicamente com dimetilsulfóxido (DMSO, Cultilab, Campinas, Brasil), com a finalidade de verificar se a morte celular presente nos grupos tratados com os extratos é decorrente unicamente ao efeito desses, uma vez que os extratos são diluídos no DMSO.

Após o tratamento com o extrato, o meio foi descartado e as células submetidas as seguintes análises: avaliação da VC pelo método de exclusão do azul de Tripán e ensaio da VC pelo método de redução do tetrazólio. Ambos os ensaios foram realizados em três experimentos independentes e em triplicatas.

### 2.4. Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Tripán

Para a avaliação da VC pelo método de exclusão do azul de Tripán, a técnica empregada foi adaptada de Mosman<sup>20</sup> e Peres & Curi<sup>21</sup>. Após o tratamento, os poços foram lavados, duas vezes, com 100µL de salina fosfato tamponada, (*phosphate buffered saline*, PBS, Cultilab, Campinas, Brasil). Em seguida, as células foram ressuspensas. Para essa suspensão, foi utilizado 100µL de tripsina (Cultilab, Campinas, Brasil) em cada poço; em seguida, as placas foram mantidas na incubadora umidificada por cinco minutos, foram homogeneizadas e mantidas por mais cinco minutos na incubadora. Logo após, a tripsina foi inativada com 100µL de DMEM.

Posteriormente, o material foi centrifugado à 1400rpm por dez minutos; o meio foi descartado; e as células ressuspensas em 1mL de DMEM. Dessa nova solução, foram transferidos 40µL para microtubos tipo *eppendorfs* contendo 40µL de azul de Tripán (*Trypan Blue* - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Em seguida, a fim de determinar o tamanho celular

(TC), a VC e a citotoxicidade celular (CT), 10µL dessa nova solução foram instilados em lâmina para a leitura do equipamento contador automático de células *Luna Automated Cell Counter*. A CT foi estimada através da equação:

$$\%CT = 100 - [(abs \text{ do tratamento} / abs \text{ do controle negativo}) \times 100] \text{ (equação 1)}$$

Sendo CT a citotoxicidade e abs a absorbância.

Os dados obtidos foram analisados pelo Teste *Scott Knott*; foi calculado a média do TC, VC e CT para cada grupo de tempo de exposição ( $G_{24}$ ,  $G_{48}$  e  $G_{72}$ ) de ambos os extratos (EBFG e EAFG).

### 2.5. Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio (MTT)

O ensaio da viabilidade celular pelo MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphnyl-2H-tetrazólio] foi realizado a partir da adaptação da técnica descrita por Yu et al<sup>19</sup>. Após o tratamento, foi adicionado, em cada poço, 10µL de MTT, previamente diluído em salina fosfato tamponada, *phosphate buffered saline* (PBS, Cultilab, Campinas, Brasil) na proporção de 500mg de MTT para 100mL de PBS, e as placas mantidas na incubadora umidificada por três horas. Logo depois, foi adicionado, a fim de interromper a reação, 50µL de sódio dodecil sulfato (*sodium lauryl sulfate*, SDS, Vivantis Biochemical) a 10% e as placas mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. A solução de SDS 10% foi preparada a partir de 1g de SDS; 9mL de solução de ácido clorídrico a 0,01N; 0,15mL de ácido clorídrico e 499,85mL de água destilada.

Posteriormente, a densidade óptica dos poços foi quantificada em espectrofotômetro (*Awareness Technology Inc/ Stat Fax 2100*, 425nm – 540nm, Palm City, FL, USA) e o valor da concentração que inibe 50% da viabilidade celular (*Inhibitory concentration* - IC<sub>50</sub>, em µL/mL) foi determinado por meio do programa estatístico *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 3. Resultados e Discussão

Através do ensaio de exclusão do azul de Tripan foi calculada a média do TC, VC e CT para as concentrações utilizadas (0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL) nos três tempos de exposição ( $G_{24}$ ,  $G_{48}$  e  $G_{72}$ ) de ambos os extratos (EBFG e EAFG). Esse ensaio é um método utilizado para a avaliação da citotoxicidade por meio da mensuração da VC. Essa análise permite identificar as células inviáveis, pois essas células são coradas e as viáveis não. Essas, não permitem que o corante, azul de Tripan, penetre no meio intracelular devido à

integridade das suas membranas. Já as células mortas, em razão das suas membranas danificadas, propiciam a passagem do corante e coram-se em azul.

Em relação ao EBF, os três parâmetros não apresentaram diferença estatísticas entre as concentrações utilizadas para os grupos G<sub>24</sub> e G<sub>72</sub>, assim como o TC no G<sub>48</sub>. Entretanto, a VC e a CT do G<sub>48</sub> apresentaram diferença estatística entre as concentrações 0µL/mL e 0,1µL/mL em relação às 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL, conforme Tabela 1.

TABELA 1 - Média dos parâmetros tamanho celular (TC), viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) para cada grupo de concentração (0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL) do extrato etanólico bruto das folhas da gabirobeira (EBFG) em relação ao tempo de exposição (24, 48 e 72 horas). Os dados foram calculados pelo teste estatístico *Scott Knott* a partir dos valores obtidos do equipamento contador automático de células *Luna Automated Cell Counter* da análise de VC pelo método de exclusão do Azul de Tripán. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata.

Tempo de exposição	Parâmetro	Concentração do EBF				
		0µL/mL	0.1µL/mL	1µL/mL	10µL/mL	100µL/mL
24 horas	%TC	100	99.35	93.7	99.47	100.19
	%VC	100	62.6	71.19	96	62.6
	%CT	100	123.62	128.42	111.15	131.62
48 horas	%TC	100	112.67	101.97	107.52	106.22
	%VC	100	85.7	57.26*	25.79*	40.29*
	%CT	100	137.56	185.6*	219.04*	200.17*
72 horas	%TC	100	100	96.97	94.43	88.65
	%VC	100	118.61	99.89	82.82	76.34
	%CT	100	102.48	114.51	136.05	132.56

\*Diferença estatística em relação ao grupo controle (0µL/mL), porém sem diferença entre si.

Diante disso, é possível constatar que o EBF não apresentou ação dose e tempo dependente, o G<sub>48</sub> apresentou maior potencial do que o G<sub>24</sub> e G<sub>72</sub>, isso pode sugerir que a sua ação citotóxica diminui com determinado tempo de exposição. Nesse sentido, faz-se necessário investigar o seu efeito em tratamentos consecutivos durante o tempo de exposição. Além disso, também é possível constatar que dentre as concentrações utilizadas no G<sub>48</sub>, as concentrações 1µL/mL e 10µL/mL e 100µL/mL apresentaram resultados significativamente melhores. Porém

destaca-se a 1µL/mL, pois é a menor dentre elas e, por conseguinte, possui, em tese, menores efeitos adversos.

No que se refere ao EAFG, não houve diferença estatística entre as concentrações utilizadas (0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL) nos três tempos de exposição (G<sub>24</sub>, G<sub>48</sub> e G<sub>72</sub>) em nenhum dos três parâmetros analisados (TC, VC e CT), conforme a Tabela 2. Assim, verifica-se que o EAFG possui maior potencial antiproliferativo do que o EAFG, pois aquele demonstrou menor VC e maior CT. Tal fato sugere que os compostos responsáveis pelo efeito citotóxico estão em menor quantidade na fração acetato. O extrato etanólico da *Mesona Palustris BL* também apresentou maior citotoxicidade, IC<sub>50</sub> 146,0µg/mL, em relação ao acetato de etila, IC<sub>50</sub> 182,96 µg/mL<sup>22</sup>.

TABELA 2 - Média dos parâmetros tamanho celular (TC), viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) para cada grupo de concentração (0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL) do extrato acetato das folhas da gabirobeira (EAFG) em relação ao tempo de exposição (24, 48 e 72 horas). Os dados foram calculados pelo teste estatístico *Scott Knott* a partir dos valores obtidos do equipamento contador automático de células *Luna Automated Cell Counter* da análise de VC pelo método de exclusão do Azul de Tripán Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata.

Tempo de Exposição	Parâmetro	Concentração do EAFG				
		0µL/mL	0.1µL/mL	1µL/mL	10µL/mL	100µL/mL
24 horas	%TC	100	76.63	88.79	87.88	88.32
	%VC	100	119.58	151.19	163.95	96.86
	%CT	100	117.56	94.96	107.97	113.67
48 horas	%TC	100	81.67	84.39	96.08	82.16
	%VC	100	56.14	116.29	95.47	83.14
	%CT	100	132.5	90.92	104.43	116.3
72 horas	%TC	100	96.6	94.54	90.99	88.22
	%VC	100	89.62	92.26	61.59	80.34
	%CT	100	129.97	101.86	142.63	117.56

Comparando o TC dos dois extratos utilizados, nota-se que os grupos G<sub>24</sub>, G<sub>48</sub> e G<sub>72</sub> tratados com o EAFG apresentaram TC maior em comparação com os grupos tratados com o EAFG. Porém, os grupos G<sub>24</sub> e G<sub>72</sub> não apresentaram diferença estatística entre os extratos

utilizados, ao contrário do G<sub>48</sub>, conforme Figura 1. Além disso, o TC do grupo G<sub>72</sub> de ambos os extratos foi inversamente proporcional a CT, o TC foi menor com o aumento da CT. O encolhimento celular, condensação e fragmentação nuclear durante a apoptose de células neoplásicas, como as linhagens celulares de câncer de fígado, pulmão e cólon, foram relatados na *Hedyotis difusa*<sup>23</sup>. Entretanto, o TC dos grupos G<sub>24</sub> e G<sub>48</sub> de ambos os extratos apresentaram TC diretamente proporcional a CT e inversamente proporcional a VC. A indução à morte de células neoplásicas pode ser sucedida de proliferação das células sobreviventes à terapia, o que pode resultar em uma maior variabilidade genética e seleção de células neoplásicas com aptidão superior<sup>24</sup>. Logo, o TC elevado nesses grupos pode sugerir uma seleção de células neoplásicas.

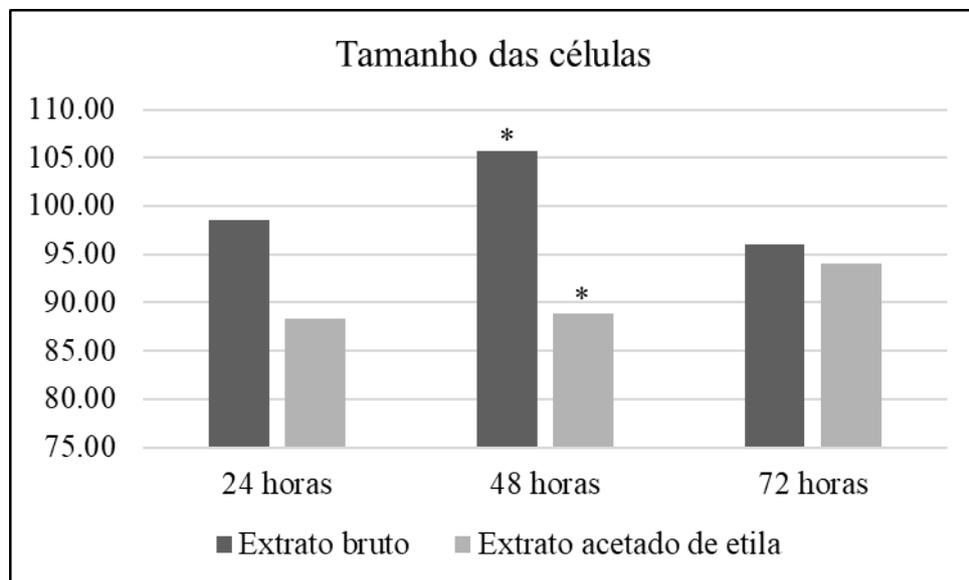


FIGURA 1 - Representação gráfica da média dos valores tamanho das células (TC), obtidos por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán. As células de osteossarcoma foram submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto e acetato das folhas da *C. adamantium* nas concentrações 0,1µL/mL, 1µL/mL, 10µL/mL e 100µL/mL durante 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada extrato.

\*Houve diferença estatística entre os extratos bruto e acetado.

Em relação a VC, essa teve uma redução progressiva para o EAFG. Já para o EBF, teve redução progressiva apenas entre os intervalos de 24 e 48 horas; de 48 a 72 horas teve um aumento progressivo. Além disso, a VC dos grupos G<sub>24</sub> e G<sub>48</sub> foi menor para o EBF em comparação com EAFG. Todavia, a VC do G<sub>72</sub> foi menor quando submetido ao EAFG. Os G<sub>24</sub> e G<sub>48</sub> também apresentaram diferença estatística entre os extratos, enquanto o G<sub>72</sub> não mostrou diferença, conforme Figura 2. Diante disso, nota-se que o G<sub>48</sub> do EBF apresentou menor VC.

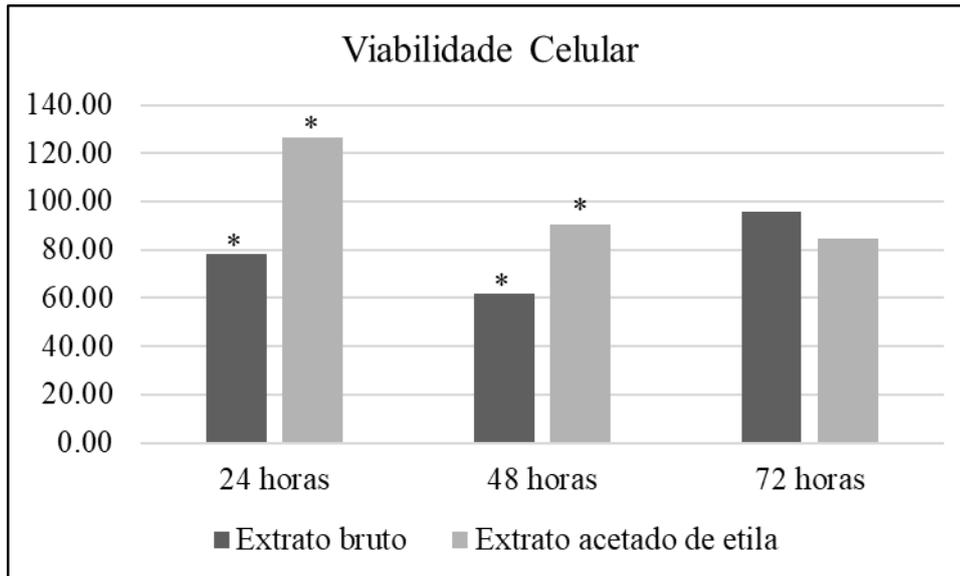


FIGURA 2 - Representação gráfica da média dos valores da viabilidade celular (VC) obtidos por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán. As células de osteossarcoma foram submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto e acetato das folhas da *C. adamantium* nas concentrações 0,1 $\mu$ L/mL, 1 $\mu$ L/mL, 10 $\mu$ L/mL e 100 $\mu$ L/mL durante 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada extrato.

\*Houve diferença estatística entre os extratos bruto e acetado.

Já no tocante à CT, os grupos  $G_{24}$  e  $G_{48}$  apresentaram maior CT quando submetidos ao tratamento com EBF, enquanto que o  $G_{72}$  apresentou menor CT. Porém apenas o  $G_{48}$  apresentou diferença estatística entre os tratamentos utilizados, conforme Figura 3. Isso corrobora com a hipótese de que o EBF possui maior citotoxicidade que o EAF e que provavelmente os compostos responsáveis por essa ação citotóxica não estão presentes na fração EAF. Além do mais, o intervalo de 48 horas do EBF apresenta melhor potencial antineoplásico e sua ação reduz com o tempo, a partir das 48 horas.

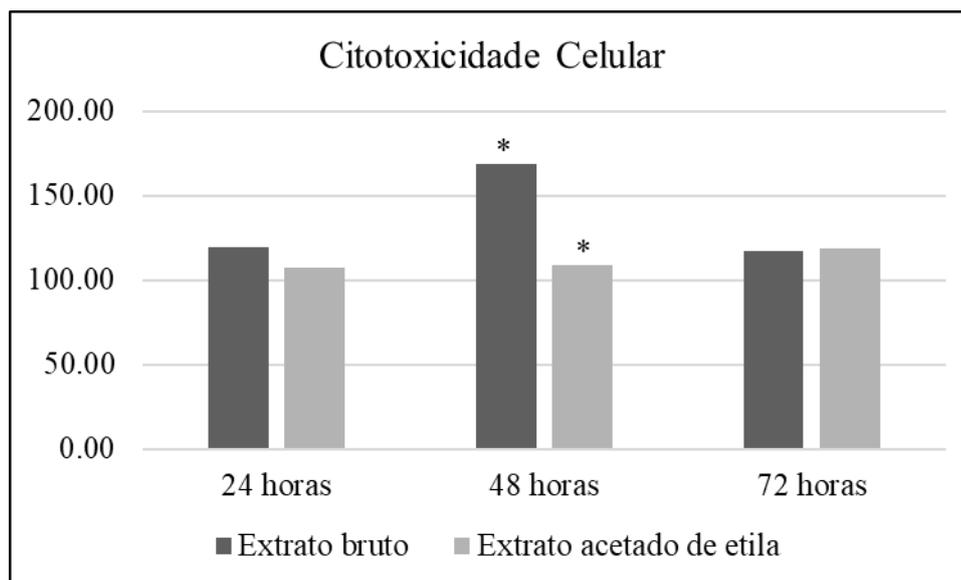


FIGURA 3 - Representação gráfica da média dos valores da citotoxicidade celular (CT), obtidos por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán. As células de osteossarcoma foram submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto e acetato das folhas da *C. adamantium* nas concentrações 0,1 $\mu$ L/mL, 1 $\mu$ L/mL, 10 $\mu$ L/mL e 100 $\mu$ L/mL durante 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada extrato.

\*Houve diferença estatística entre os extratos bruto e acetado.

O IC<sub>50</sub>, concentração necessária para inibir 50% das células *in vitro*, foi calculado a partir dos dados do ensaio da VC pelo MTT, por meio do programa estatístico *GraphPad Prism*. O ensaio do MTT é um teste colorimétrico, em que as medidas de absorbância são medidas no final do ensaio. O tetrazólio do MTT, composto de coloração amarela, é clivado pelas desidrogenases mitocondriais e agentes redutores presentes nas células viáveis em cristais de formazan, composto de coloração azul.

Em relação ao EBF, esse apresentou aumento progressivo do IC<sub>50</sub> com o tempo de exposição ao extrato. Entretanto, o seu valor do G<sub>48</sub> situou-se no intervalo proposto de melhor citotoxicidade, conforme Figura 4. O valor elevado do IC<sub>50</sub> no G<sub>72</sub> corrobora com os resultados encontrados na avaliação da citotoxicidade, em que houve menos morte celular em relação ao G<sub>48</sub>. Por conseguinte, reforça a tese que a ação desse extrato diminui com o tempo de exposição; portanto, é necessário investigar a atividade antiproliferativa desse extrato por meio de tratamentos consecutivos ao longo do tempo de exposição.

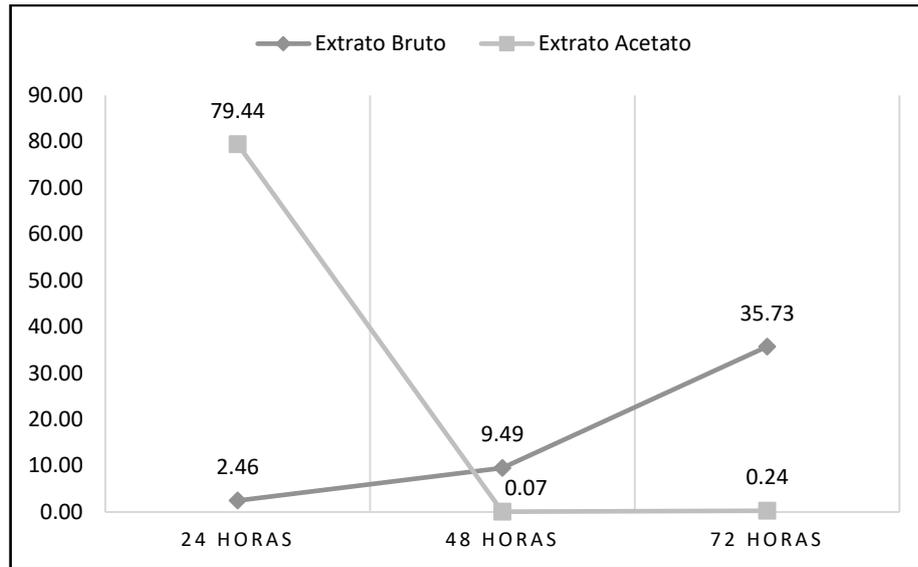


FIGURA 4 - Representação gráfica dos valores da concentração necessária para inibir 50% ( $IC_{50}$  em  $\mu\text{L/mL}$ ), calculado por meio do ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio (MTT). As células de osteossarcoma da linhagem MG-63 foram submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto e acetato das folhas da gabirobeira (*C. adamantium*) nas concentrações 0,1 $\mu\text{L/mL}$ , 1 $\mu\text{L/mL}$ , 10 $\mu\text{L/mL}$  e 100 $\mu\text{L/mL}$  durante 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio, foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada extrato.

Uma consideração relevante ao extrato da *C. adamantium* é a relação entre o material botânico utilizado e o seu potencial citotóxico. Em análise da atividade antiproliferativa do extrato aquoso das suas folhas e raízes em leucemia, constatou-se, respectivamente,  $IC_{50}$  de 40 $\mu\text{g/mL}$  e 80 $\mu\text{g/mL}$  em células Jurkat (linfócitos T neoplásicos)<sup>10</sup>. Assim, apesar de já ter sido demonstrado o potencial citotóxico das suas folhas<sup>10, 11</sup>, é necessário pesquisar outros tipos de materiais botânicos.

A linhagem celular empregada nas análises é outro fator a ser considerado. Na leucemia, o extrato aquoso das folhas da *C. adamantium*, não apresentou efeito significativo nas células mononucleares do sangue periférico enquanto que nas de Jurkat demonstrou atividade citotóxica. O mesmo trabalho demonstrou que a vimblastina promoveu morte celular tanto nas células mononucleares do sangue periférico quanto nas de Jurkat, porém apresentou valores distintos de  $IC_{50}$ , respectivamente, 25,9 $\mu\text{g/mL}$  e 9,5 $\mu\text{g/mL}$ <sup>10</sup>.

#### **4. Conclusão**

A partir da análise dos resultados obtidos, conclui-se que o extrato etanólico das folhas da gabiroba (*Campomanesia adamantium*) possui efeito citotóxico em células de osteossarcoma da linhagem MG-63, sendo mais acentuado no extrato bruto do que no acetato de etila e após 48 horas de tratamento àquele extrato.

## Referências

1. Brown HK, Schiavone K, Gouin F, Heymann M-F, Heymann D. Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. *Calcif Tissue Int.* 2017;102(2):174-95.
2. Xie D, Zheng GZ, Xie P, Zhang QH, Lin FX, Chang B, Hu QX, Du SX, Li XD. Antitumor activity of resveratrol against human osteosarcoma cells: A key role of Cx43 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncotarget.* 2017;8(67):111419-32.
3. Evola FR, Costarella L, Pavone V, Caff G, Cannavò L, Sessa A, Avondo S, Sessa G. Biomarkers of Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Ewing Sarcoma. *Front in Pharmacol.* 2017;8:150.
4. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. WHO classification of bone tumours. In: Dorfman HD, Czerniak B, Vanel D, Park YK, Kotz R, Unni KK. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Lyon, France; 2002. 225-32.
5. Ritter J, Bielack SS. Osteosarcoma. *Annals of Oncology.* 2010;21(suppl\_7):vii320-vii5.
6. Mercatelli D, Bortolotti M, Bazzocchi A, Bolognesi A, Polito L. Immunoconjugates for Osteosarcoma Therapy: Preclinical Experiences and Future Perspectives. *Biomedicines.* 2018;6(1):19.
7. Harrison DJ, Schwartz CL. Osteogenic Sarcoma: Systemic Chemotherapy Options for Localized Disease. *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18(4):24.
8. Zhang Y, Song L, Cai L, Wei R, Hu H, Jin W. Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Food Chem Toxicol.* 2013;53:325-33.
9. Silva EP, Vilas Boas EVdB, Rodrigues LJ, Siqueira HHS. Caracterização física, química e fisiológica de gabioba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2009;29.
10. Campos JF, Espindola PPdT, Torquato HFV, Vital WD, Justo GZ, Silva DB, Carollo CA, Picoli SKd, Paredes-Gamero EJ, Santos ELd. Leaf and Root Extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3. *Frontiers in Pharmacology.* 2017;8:466.
11. Pascoal AC, Ehrenfried CA, Lopez BG, de Araujo TM, Pascoal VD, Gilioli R, Anhê GF, Ruiz AL, Carvalho JE, Stefanello ME, Slavador MJ. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules.* 2014;19(2):1843-55.
12. Vieira MC, Perez VB, Heredia ZNA, Santos MC, Pelloso IAO, Pessoa SM. Nitrogênio e fósforo no desenvolvimento inicial da guavira [*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg] cultivada em vasos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* 2011;13:542-9.

13. Amaral EVEDJ, Reis EFd, Ressel K, Pinto J, Naves F. Descrição morfológica de duas espécies de *Campomanesia RUIZ & PAVON* (MYRTACEAE). *Revista Agrotecnologia*. 2016;7(1):42-52.
14. Vallilo MI, Lamardo LCA, Gaberlotti ML, Oliveira Ed, Moreno PRH. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. *Food Science and Technology*. 2006;26:805-10.
15. Viscardi DZ, Oliveira VSd, Arrigo JdS, Piccinelli AC, Cardoso CAL, Maldonade IR, Kassuya ALC, Sanjinez-Argandoña EJ. Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2017;27(2):220-7..
16. Cardoso CA, Salmazzo GR, Honda NK, Prates CB, Vieira Mdo C, Coelho RG. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). *J Med Food*. 2010;13(5):1273-6.
17. Ferreira LC, Grabe-Guimarães A, de Paula CA, Michel MCP, Guimarães RG, Rezende SA, Souza JDFD, Saúda-Guimarães DA. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;145(1):100-8.
18. Fernandes TdO, Ávila RId, Moura SSd, Ribeiro GdA, Naves MMV, Valadares MC. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Toxicology Reports*. 2015;2:184-93.
19. Yu HY, Kim SO, Jin CY, Kim GY, Kim WJ, Yoo YH, Choi YH.  $\beta$ -lapachone-Induced Apoptosis of Human Gastric Carcinoma AGS Cells Is Caspase-Dependent and Regulated by the PI3K/Akt Pathway. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014;22(3):184-92.
20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
21. Peres CM, Curi R. *Como Cultivar células*. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan;2005,304.
22. Widyaningsih TD. Cytotoxic Effect of Water, Ethanol and Ethyl Acetate Extract of Black Cincau (*Mesona Palustris* BL) Against HeLa Cell Culture. *APCBEE Procedia*. 2012;2:110-4.
23. Lee HZ, Bau DT, Kuo CL, Tsai RY, Chen YC, Chang YH. Clarification of the phenotypic characteristics and anti-tumor activity of *Hedyotis diffusa*. *Am J Chin Med*. 2011;39(1):201-13.
24. Labi V, Erlacher M. How cell death shapes cancer. *Cell Death & Disease*. 2015;6(3):e1675.

### CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O osteossarcoma é a neoplasia óssea maligna mais diagnosticada em humanos. É altamente agressivo e possui prognóstico reservado a desfavorável. Ademais, os quimioterápicos utilizados atualmente possuem diversos limitantes, como os efeitos adversos. Nesse sentido, há uma demanda crescente por novos fármacos, com menores reações aos pacientes.

Nesse contexto, foi investigado o potencial citotóxico do extrato etanólico das folhas da gabirobeira (*C. adamantium*) sobre as células de osteossarcoma da linhagem MG-63, visto que a atividade antiproliferativa das folhas dessa planta foi demonstrada em outras neoplasias. Como não existem dados sobre o potencial desse extrato no osteossarcoma, tratou-se de um estudo original. Foi analisado tanto o extrato etanólico bruto quanto o acetato de etila.

Constatou-se que a *C. adamantium* possui ação citotóxica nessas células, sendo um promissor agente antineoplásico. Entretanto, o extrato bruto apresentou maior citotoxicidade celular do que o acetato de etila. Tal fato pode sugerir que os compostos responsáveis pela ação citotóxica do extrato etanólico das folhas da *C. adamantium* não estão presentes na fração do acetato de etila. Sendo necessário o estudo de outras frações do extrato bruto para averiguar os possíveis compostos com ação citotóxica. Além disso, o extrato bruto não apresentou ação dose e tempo dependente, isso pode sugerir que a sua ação citotóxica diminui com determinado tempo de exposição. Nesse sentido, faz-se necessário investigar o seu efeito em tratamentos consecutivos durante o tempo de exposição.

Ademais, o mesmo grupo de pesquisa está estudando os efeitos citotóxicos do extrato bruto e acetato de etila das folhas da gabirobeira em células de osteossarcoma canino da linhagem D-17. Dessa forma, será possível comparar a atividade antiproliferativa das folhas da *C. adamantium* entre as linhagens celulares humana e canina dessa neoplasia. Essa comparação é de suma importância, uma vez que o osteossarcoma canino é considerado um modelo de estudo para o humano devido as semelhanças entre ambos.

Presume-se que os resultados apresentados possam colaborar com novos experimentos com a *C. adamantium* e, por conseguinte, propiciar uma alternativa para o tratamento do osteossarcoma. Também se acredita que essa pesquisa contribua com a valorização dos recursos naturais, especialmente do cerrado brasileiro, perante às propriedades medicinais e terapêuticas de diversas plantas, como a *C. adamantium*.

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG)



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** PROPRIEDADES CITOTÓXICAS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DA GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium*) EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA IN VITRO

**Pesquisador:** NARA CRISTINA SILVA

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 61617816.2.0000.5083

**Instituição Proponente:** Escola de Veterinária e Zootecnia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.856.800

**Apresentação do Projeto:**

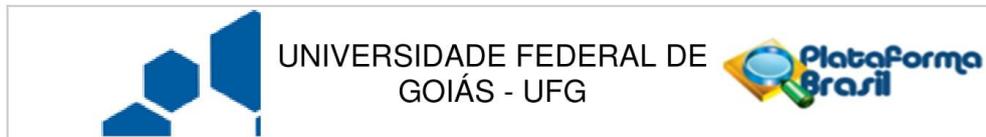
O osteossarcoma é o tumor de maior representatividade dentro das neoplasias ósseas, acometendo, principalmente, jovens e crianças. Os tratamentos disponíveis além de não conferirem boas taxas de sobrevida, causam reações adversas. Com isso, há uma crescente busca por tratamentos alternativos. O potencial inibitório de frutos de *Campomanesia* contra células cancerígenas já foi confirmado em modelos animais. Por esse motivo, um estudo in vitro com linhagens celulares neoplásicas, como o osteossarcoma, contribuirá na identificação das suas substâncias bioativas, além da compreensão do seu mecanismo de ação contras essas células. O objetivo deste estudo é verificar os efeitos citotóxicos do extrato das folhas da gabirobeira em células do osteossarcoma in vitro de cultura estabelecida, identificando os mecanismos de ação que possam explicar suas propriedades antineoplásicas e genotóxicas no DNA das células tumorais.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Verificar os efeitos intracelulares do extrato hidroalcoólico das folhas da gabirobeira (EHFG) em

**Endereço:** Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131  
**Bairro:** Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.856.800

células cultivadas de osteossarcoma.

**Objetivo Secundário:**

Avaliar a citotoxicidade pela análise da viabilidade das células de osteossarcoma tratadas com exposição ao EHFG por 24 a 72 horas;

Calcular o valor da concentração que inibe 50% da viabilidade celular e as frações de sobrevivência após o tratamento com o EHFG;

Analisar e classificar a morte celular que ocorre como consequência do tratamento com EHFG e a ocorrência de despolarização mitocondrial;

Verificar a progressão do ciclo celular e apoptose após exposição de 24 a 72 horas ao EHFG.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De acordo com o que está apresentado nas informações básicas do projeto, os riscos apresentados pela pesquisadora constituem riscos técnicos, com prejuízos apenas para as análises laboratoriais, não representam riscos diretos ao ser humano (doador das células que estão armazenadas no banco de células).

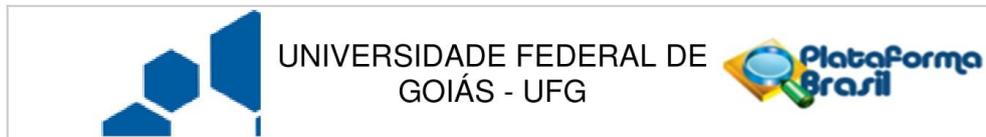
Como benefícios, a pesquisadora aponta: "Espera-se que o extrato hidroalcolólico das folhas da *C. adamantium* apresentem ação antiproliferativa e citotóxica nas células de osteossarcoma. O resultado positivo para essa ação citotóxica contribuirá como uma alternativa viável e sustentável para os tratamentos quimioterápicos disponíveis

atualmente. Além disso, a determinação da menor dose, no menor tempo possível, para alcançar a eficiência em impedir o crescimento de células tumorais é importante para minimizar os efeitos adversos in vivo. Por fim, acredita-se que os impactos dessa pesquisa contribuam para uma maior valorização dos recursos naturais do Cerrado, principalmente em relação a sua preservação e exploração sustentável."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O presente projeto será desenvolvido no Laboratório Multiusuário de Cultivo Celular da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG). As células de osteossarcoma (MG-63) serão adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, mantidas em incubadora umidificada à 37°C com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O cultivo será feito em meio Dulbecco modificado de Eagle19, acrescido 10% de soro fetal bovino, antibióticos penicilina e estreptomicina, anfotericina B e L-glutamina. O extrato hidroalcolólico será preparado a partir das

<b>Endereço:</b> Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131			
<b>Bairro:</b> Campus Samambaia	<b>CEP:</b> 74.001-970		
<b>UF:</b> GO	<b>Município:</b> GOIANIA		
<b>Telefone:</b> (62)3521-1215	<b>Fax:</b> (62)3521-1163	<b>E-mail:</b> cep.prpi.ufg@gmail.com	



Continuação do Parecer: 1.856.800

folhas secas e fragmentadas de *C. adamantium*, pelo método de extração por maceração, seguindo-se metodologia adequada. Após análise físico química, será obtida a densidade de extrato bruto ativo, que será utilizada para a determinação da concentração do extrato a ser adicionada aos tratamentos. As células de osteossarcoma serão semeadas em placas de cultura divididas em doze grupos, os quais serão submetidos ou não a tratamentos com o extrato das folhas da gabirobeira, de acordo com a concentração previamente preparada. Todos os ensaios serão realizados com três experimentos independentes em triplicata. A citotoxicidade celular será determinada através de ensaios em placas de 96 poços, os dados serão representados por meio de gráficos e será realizada a análise de variância, a qual será efetivada utilizando-se o teste F. Para calcular o valor da concentração que inibe 50% da viabilidade celular (Inhibitory concentration - IC50), serão utilizadas placas de 96 poços, com células na concentração de  $1 \times 10^4$ . O IC50 será determinado utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O Ensaio Clonogênico será feito em placas de seis poços, com células na concentração de  $1 \times 10^6$ . Os dados serão representados por meio de gráficos e a análise estatística por meio de Teste F. A análise do ciclo celular será feita utilizando-se placas de 12 poços com células na concentração de  $5 \times 10^5$ . A porcentagem de células em G1, S, G2 e sub-G1 será analisada em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences) e avaliada pelo programa de gráficos estatísticos GraphPad Prism. Para o Ensaio de Dupla Marcação, as células serão cultivadas e tratadas em placas de 12 poços, na concentração de  $5 \times 10^5$ . O material será analisado pelo citômetro de fluxo e os dados serão avaliados pelo GraphPad Prism. No Ensaio Potencial de Membrana Mitocondrial, as células serão cultivadas em placas de doze poços, na concentração de  $5 \times 10^5$ . Os resultados serão obtidos por meio do citômetro de fluxo e analisados pelo GraphPad Prism.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

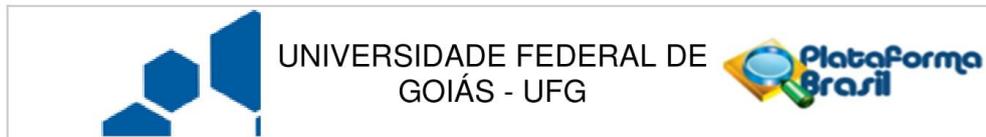
A pesquisadora solicita dispensa de TCLE, uma vez que os trabalhos serão realizados com células de osteossarcoma (MG-63) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, não envolvendo coleta em ser humano.

Documentos apresentados: folha de rosto, termo de anuência da escola de Veterinária e Zootecnia da UFG para desenvolvimento da pesquisa, termo de compromisso assinado pelo pesquisador e pelo orientador.

#### **Recomendações:**

-

**Endereço:** Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131  
**Bairro:** Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.856.800

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado, SMJ deste comitê.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para dezembro de 2017.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_815554.pdf	03/11/2016 14:48:11		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso.pdf	03/11/2016 14:46:12	NARA CRISTINA SILVA	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia.pdf	01/11/2016 15:34:24	NARA CRISTINA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	01/11/2016 15:33:41	NARA CRISTINA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_Nara.pdf	26/10/2016 12:17:52	NARA CRISTINA SILVA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

GOIANIA, 08 de Dezembro de 2016

Assinado por:  
João Batista de Souza  
(Coordenador)

**Endereço:** Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131  
**Bairro:** Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com

## ANEXO B - Soluções preparadas

## 1- Solução de SDS 10%:

1g de Sódio dodecil sulfato (*sodium lauryl sulfate*, SDS, Vivantis Biochemical)

9mL de solução de ácido clorídrico a 0,01N

0,15mL de ácido clorídrico

499,85mL de água destilada