



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
Coordenadoria Geral de Pesquisa – CGP

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga
Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 215-5564 – Fone/Fax (86) 215-5560
E-mail: pesquisa@ufpi.br; pesquisa@ufpi.edu.br

Atividade anticâncer de proteínas do látex de *Calotropis procera*.

Douglas Lima Machado (bolsista ICV-UFPI); Prof. Dr. Marcio Viana Ramos (colaborador, Dpto. Bioquímica e Biologia Molecular, UFC); Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira (orientador, UFPI).

Introdução

A incidência de câncer cresce a cada ano e por todo o mundo, não discriminando raça, sexo ou classe social (WHO, 2010). O melhor tratamento para a maioria dos tumores sólidos é o método cirúrgico combinado com tratamento quimioterápico e radioterapia, enquanto que para o câncer diagnosticado em fase avançada ou em metástase, o tratamento inclui o uso de quimioterápicos (Downey, 1999; Qian *et al.*, 2003). Em virtude dos efeitos colaterais promovidos pelas drogas antitumorais durante o tratamento, o uso de plantas medicinais como um método complementar ao tratamento do câncer é crescente embora a eficácia do uso destas plantas não seja cientificamente comprovada (Yates *et al.*, 2005; Molassioti *et al.*, 2005). As drogas antitumorais atualmente utilizadas no combate aos diferentes tipos de câncer são bastante eficientes ao que se propõem já que, por atuarem nas células em divisão, diminuem significativamente ou eliminam as células cancerígenas. Em contrapartida, como estes compostos, em muitos casos, não são capazes de promover uma distinção completa entre uma célula sadia e uma neoplásica e estão associados à ação anticâncer vários efeitos indesejáveis como náuseas, vômito, depressão da medula óssea, e leucopenia, como, por exemplo, observado em pacientes em tratamento com o 5-fluorouracil (5-FU) (Plasschaert *et al.*, 2004; Connors, 2005; Cragg & Newmas, 2005). Além disso um dos fatores mais importantes relacionados à necessidade de se encontrar novos agentes anticâncer está relacionado à resistência adquirida por vários tipos de tumores sensíveis a fármacos (Kummar *et al.*, 2004). Assim surge a necessidade da identificação de novas substâncias eficientes para o tratamento de câncer como o uso terapêutico de proteínas de origem vegetal como terapia complementar ao uso de compostos proveniente do metabolismo secundário de plantas. Na medicina tradicional da Índia, a planta *C. procera* é amplamente utilizada no tratamento de tumores (Kumar & Arya, 2006). Estes relatos são confirmados por estudos científicos. Extratos das flores e raízes apresentaram citotoxicidade contra diferentes linhagens celulares testadas (Smith *et al.*, 1995; Quaquebeke *et al.*, 2005; Juncker *et al.*, 2009; Mathur *et al.* 2009). Referente ao látex da planta, um trabalho descrevendo a presença de atividade citotóxica e antitumoral *in vivo* foi publicado em 2006 (Choedon *et al.*, 2006). Os autores obtiveram uma fração após extração do látex íntegro com água e esta, quando administrada por via oral, protegeu camundongos contra carcinoma hepatocelular de animais transgênicos. Essas informações nos mostra claramente que estudos bioquímicos e de identificação das moléculas envolvidas em tais atividades precisam ser desenvolvidos. No ano de 2007, Oliveira e colaboradores mostraram que proteínas do látex de *C. procera* apresentaram atividade citotóxica direcionada a células neoplásicas de carcinomas humanos, não afetando células normais. Foi ainda verificado que esta atividade induzia apoptose e que a atividade da enzima topoisomerase I sobre o DNA é significativamente reduzida na presença das proteínas laticíferas. Embora tenhamos obtido uma fração consideravelmente homogênea, a identificação de proteínas envolvidas na atividade anticâncer é uma prioridade que pode ser desenvolvida através de etapas cromatográficas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi fracionar e caracterizar proteínas do látex de *C. procera* visando a identificação de proteínas com atividade citotóxica contra células tumorais humanas.

Metodologia

O látex de *C. procera* foi coletado em água destilada em uma razão de 1:1 (v:v). As amostras foram centrifugadas a temperatura de 4 °C durante 10 minutos com velocidade de aproximadamente 5.000 x g. O sobrenadante foi submetido à diálise contra água destilada durante 2 dias. O material foi novamente centrifugado e o novo sobrenadante, rico em proteína foi liofilizado e denominado Proteínas do Látex (PL). Esta fração protéica foi submetida a fracionamento por cromatografia para produzir novas frações semi-purificadas. A primeira estratégia utilizada foi a cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow utilizando tampão acetato 50 mM pH 5,0. Este procedimento gerou três sub-frações (PI, PII e PIII) sendo PI submetido a um novo procedimento de fracionamento. Neste momento foi utilizado uma coluna de filtração em gel (Sephacryl S-100) utilizando tampão acetato de amônio, pH 7,0. Todas as frações dos dois métodos cromatográficos utilizados foram coletadas e a eluição das proteínas foi acompanhada através da leitura das absorbâncias a 280 nm. Após etapas cromatográficas, o conteúdo protéico das sub-frações foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) e quanto à presença da atividade citotóxica sobre células tumorais humanas [HL-60 (leucemia), HCT-8 (côlon), MDA-MB-435 (melanoma) e SF295 (glioblastoma)] utilizando o método de MTT.

Resultados e Discussão

Após obtenção da fração protéica do látex de *C. procera* (PL), este foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow em pH 5,0. A etapa cromatográfica levou a obtenção de três sub-frações protéicas denominadas PI, PII e PIII. Eletroforese em gel de poliacrilamida revelou que PI apresentou perfil protéico distinto de PII e PIII, sendo constituído essencialmente por proteínas com peso molecular acima de 30 kDA. A partir desta análise, podemos inferir que as três sub-frações apresentam diferentes conteúdos protéicos. As três sub-frações cromatográficas, foram em seguida avaliadas quanto à toxicidade contra células tumorais humanas. Para tanto, as células foram tratadas com diferentes concentrações de PL e PI, PII e PIII. PL apresentou citotoxicidade contra as quatro linhagens celulares avaliadas com valores de IC50 variando entre 0,42 a 1,36 µg/ml para SF295 e MDA-MB-435, respectivamente. A fração PI foi detentora de quase toda atividade citotóxica presente em PL enquanto PII e PIII foram desprovidas de tal atividade nas concentrações avaliadas. Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade corroboraram com os dados apresentados por Oliveira e colaboradores (2007). Em seu trabalho, foi demonstrado que proteínas do látex de *C. procera* apresentaram citotoxicidade contra diferentes linhagens testadas. Após observação que PI é detentora de atividade citotóxica, esta fração foi alvo de nova etapa cromatográfica. Como nova estratégia de purificação, PI foi aplicado em uma coluna de filtração em gel Sephacryl S-100. O re-fracionamento de PI, rendeu oito novas frações que foram selecionadas após análise da separação das proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os oito novos picos cromatográficos (PI-1, PI-2, ..., PI-7, PI-8) foram investigados quanto a presença de atividade citotóxica e os resultados analisados. Nenhuma das novas frações inibiu o crescimento da célula de melanoma MDA-MB435. PI-1, PI-3, PI-5 e PI-6 promoveram inibição ente 49% e 74% do crescimento das células HCT-8 e SF295, sendo o melhor desempenho obtido pela fração PI-6 que inibiu 73,95% do crescimento das células SF295. Este conjunto de dados sugere que a citotoxicidade de PI é promovida através da ação conjunta de diferentes proteínas. Além dos dados obtidos, observamos que PI não apresentou atividade proteolítica quando analisado através de zimograma em gel contendo gelatina sugerindo que a atividade proteolítica anteriormente descrita em PL (Freitas *et al.*, 2007) não está envolvida na atividade citotóxica de proteínas do látex.

Conclusão

Proteínas do látex de *C. procera* (PL) foram fracionadas através de cromatografia de troca iônica em pH 5,0. Dentre as três sub-frações obtidas, PI reteve praticamente toda atividade citotóxica presente em PL. A sub-fração PI foi re-fracionada em coluna de Sephacryl-S100 rendendo oito novas frações que foram investigadas em ensaio *in vitro*. As novas frações obtidas não foram capazes de inibir o crescimento das linhagens celulares de modo semelhante ao observado por PL ou PI, sugerindo que a atividade citotóxica observada pode estar relacionada a uma ação sinérgica de diferentes proteínas. Atividade de proteases citotóxicas parece não estar envolvida na citotoxicidade apresentada por proteínas do látex.

Apoio: UFPI, CNPq.

Referências Bibliográficas:

- 1- CHOEDON, T., MATHAN, G., ARYA S., KUMAR, V.L., KUMAR, V. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, v.12, p.2517-2522, 2006.
- 2- CONNORS, J.M. State-of-the-art therapeutics: Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, v.23, p.6400-6408, 2005.
- 3- CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *Ethnopharmacology*, v100, p.72-79, 2005.
- 4- DOWNEY, R.J. Surgical management of lung cancer. *Journal of Thoracic Imaging*, v.14, p.266-269, 1999.
- 5- FREITAS, C.D.T., OLIVEIRA, J.S., MIRANDA, M.R.A., MACEDO N.M.R., SALES M.P., VILLAS-BOAS L. A., RAMOS M.V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.45, p.781-789, 2007.
- 6- JUNCKER, T., SCHUMACHER, M., DICATO, M., DIEDERICH, M. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. *Biochem. Pharmacol.*, 78: 1-10, 2009.
- 7- KUMAR, V.L., ARYA, S. Medicinal uses and pharmacological properties of *Calotropis procera*. Em: Govil J.N. eds. *Recent Progress in Medicinal Plants*. Texas Studium Press, v.11, p.373-388, 2006.
- 8- KUMMAR, V., ABBAS, A., FAUSTO, N., ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S. *Pathology Basis of Disease*, 7 th edn. WB Saunders, China, p.1552, 2004.
- 9- MATHUR, R., GUPTA, S.K., MATHUR, S.R., VELPANDIAN, T. Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.47, p.343-348, 2009.
- 10- MOLASSIOTIS, A., FERNANDEZ-ORTEGA, P., PUD, D., OZDEN, G., SCOTT, J.A., PANTELI, V., MARGULIES, A., BROWALL, M., MAGRI, M., SELVEKEROVA, S., MADSEN, E., MILOVICS, L., BRUYNS, I., GUDMUNSDOTTIR, G., HUMMERSTON, S., AHMAD, A.M., PLATIN, N., KEARNEY, N., PATIRAKI, E. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Annals of Oncology*, v.16, p.655-663, 2005.
- 11- OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D. T.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RAMOS, M. V. *In vitro* cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. *Toxicology in vitro*, v. 21, p. 1563-1573, 2007.
- 12- PLASSCHAERT, S. L.A., KAMPS, W. A., VELLENGA, E., VRIES, E. G.E. BONT, E. S.J.M. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? *Cancer Treatment Reviews*, v.30, p.37-51, 2004.
- 13- QIAN J, FENG GS, VOGL T. Combined interventional therapies of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, v.9, p.1885-1891, 2003.
- 14- QUAQUEBEKE, E.V., SIMON, G., ANDRE, A., DEWELLE, J., EL-YAZIDI, M., BRUYNEEL, F., TUTI, J., NACOUUMA, O., GUISSOU, P., DECAESTECKER, C., BRAEKMAN, J.C., KISS, R., DARRO, F. Identification of a novel cardenolide (2''-oxovorucharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.10, p.849-856, 2005.
- 15- SMITH, H.F., WOERDENBAG, H.J., SINGH, R.H., MEULENBELD, G.J., LABADIE, R.P., ZWAVING, J.H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.47, p.75-84, 1995.
- 16- WOLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer (WHO). Quick cancer facts. Dez 1st, 2010. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; available fom: <http://www.who.int/cancer/en/index.html>.
- 17- YATES, J.S., MUSTIAN, K.M., MORROW, G.R., GILLIES, L.J., PADMANABAN, D., ATKINS, J.N., ISSELL, B., KIRSHNER, J.J., COLMAN, L.K. Prevalence of complementary and alternative medicine use in cancer patients during treatment. *Support Care Cancer*, v.13, p.806-811, 2005.

Palavras-Chave: Citotoxicidade; proteínas laticíferas; proteases cisteínicas.