

Avaliação do potencial citotóxico de extratos de *Neritina zebra* (Gastropoda: Neritidae) contra as linhagens SK-MEL-19, ACP03 e HCT-116

Evaluation of the cytotoxic potential of the extracts of *Neritina zebra* (Gastropoda: Neritidae) against SK-MEL-19, ACP03 and HCT-116 lineages

Simone Machado da Rocha

Discente do Curso de Especialização em Formação de Professores de Geociências para Educação Básica na Universidade Federal do Pará. Graduada em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA) – Campus Belém. **Endereço:** Av. Roberto Camelier, 2180 – Bairro Condor, CEP: 66033-683, Belém/PA. **E-mail:** simonemdarch@gmail.com.

Carlos Rodrigo Souza do Monte

Mestre em Doenças Tropicais pela Universidade Federal do Pará (UFPA).

Claudia Antônia Campos Rodrigues

Graduada em Engenharia de Pesca pela Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

Carlos Alberto Machado da Rocha

Docente e Pesquisador do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA) – Campus Belém. Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

RESUMO

A procura por mais substâncias, com seletividade, menos efeitos colaterais e maior potência terapêutica é de extrema relevância para a quimioterapia do câncer. Além das clássicas fontes de compostos terrestres, a pesquisa de produtos naturais de origem aquática vem se destacando na busca de novas drogas. No presente estudo, utilizamos o metanol como solvente para a obtenção de extratos brutos metanólicos do molusco gastrópode *Neritina zebra* coletado na praia do Ariramba, ilha de Mosqueiro, Belém – Pará. A possível atividade citotóxica dos extratos obtidos foi testada contra três linhagens de câncer (SK-MEL-19, ACP03 e HCT-116) por meio do Ensaio do MTT. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorubicina. Os extratos metanólicos apresentaram baixa atividade contra as linhagens, embora a doxorubicina tenha inibido em cerca de 80% o crescimento das células cancerosas.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Ensaio do MTT. *Neritina*. Produtos naturais.

ABSTRACT

*The search for more substances, with selectivity, fewer side effects and greater potency therapeutics is of extreme relevance to cancer chemotherapy. In addition to the classic sources of terrestrial compounds, the research of aquatic products has been highlighting the search for new drugs. In the present study, we used methanol as a solvent to obtain crude methanolic extracts of the gastropod *Neritina zebra* collected from the Ariramba beach, Mosqueiro Island, Belém - Pará. The possible cytotoxic activity of the extracts obtained was tested against three lineages of cancer (SK- MEL-19, ACP03 and HCT-116) by means of the MTT Assay. As a positive control, the chemotherapy drug doxorubicin was used. Methanolic extracts showed low activity against lineages, although doxorubicin inhibited the growth of cancer cells by about 80%.*

Palavras-chave: Cytotoxicity. MTT Assay. *Neritina*. Natural products.

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais ou metabólitos especiais têm sido fonte de alimentos, fragrâncias, pigmentos, inseticidas e remédios (TEIXEIRA, 2009). Desde os tempos mais remotos, elementos da natureza são utilizados como fontes de medicamentos. As buscas baseiam-se na extensa diversidade química das espécies de plantas, microrganismos, fungos e animais, a qual, em última análise, é o resultado da evolução na seleção e conservação de poderosos mecanismos de defesa (ROCHA, 2013).

Além das clássicas fontes de compostos terrestres, a pesquisa de produtos naturais de origem aquática vem se destacando na busca de novas drogas. Por outro lado, a citotoxicidade é realmente a atividade biológica mais comumente encontrada e normalmente se apresenta com grande potência, o que é condizente com a função ecológica proposta para esses compostos de favorecer a competição por espaço, eliminar microrganismos patogênicos e paralisar ou matar predadores, superando os efeitos diluidores do ambiente aquático (MUNRO; KENNEPOHL; KROES, 1999).

As pesquisas mostram que, entre os animais, as fontes mais abundantes de produtos naturais bioativos são os invertebrados dos grupos dos corais, esponjas, moluscos, briozoários e ascídias (RADJASA et al., 2011). Um exemplo interessante e pioneiro é o *ziconotídeo* ou *ω -conotoxina*, um peptídeo analgésico de 25 aminoácidos isolado do molusco *Conus magnus* na década de 80 e cerca de mil vezes mais potente do que a morfina. As toxinas de *Conus* têm sido estudadas para diversas aplicações na medicina (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009).

A despeito de a Região Amazônica possuir uma biodiversidade das mais abrangentes no planeta, não a estão traduzindo em todas as possíveis riquezas para a região e para o país. No estado do Pará, moluscos da espécie *Neritina zebra* (*Gastropoda: Neritidae*) são encontrados com frequência nos levantamentos realizados nas praias de Mosqueiro e Ilha do Marajó, além de diversos outros ecossistemas paraenses. Considerando a escassez de estudos com moluscos para obtenção de moléculas bioativas e a necessidade de avanço do conhecimento acerca da biotecnologia

e da bioprospecção, base fundamental inclusive para a exploração desse tipo de recurso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antiproliferativa de extratos metanólicos do molusco *Neritina zebra* contra células cancerosas.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DE AMOSTRAS E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Espécimes do molusco *Neritina zebra* foram coletados manualmente na praia do Ariramba, ilha de Mosqueiro (coordenadas 01°04' a 01°14' de latitude sul e 48°19' a 48°29' de longitude oeste), Belém, Estado do Pará, Brasil. O material coletado foi borrifado com etanol 70% para a descontaminação superficial e lavado com água destilada.

Foram realizados dois protocolos de extração, os quais diferem apenas na primeira etapa: Protocolo 1) Animais inteiros (com concha) foram mergulhados em metanol absoluto por 72 horas; Protocolo 2) Animais com concha foram mergulhados em água fervente por 1 minuto, em seguida tiveram a concha removida e foram mergulhados em metanol absoluto por 72 horas. Nos dois protocolos, após as 72 horas

de extração, a biomassa foi descartada e a solução restante evaporada para a concentração dos extratos brutos metanólicos. No primeiro protocolo, a partir de 500g de indivíduos com concha, obteve-se 980mg de extrato (N1= 980mg); no segundo protocolo, a partir de 100g de animais sem concha, obteve-se 260mg de extrato (N2 = 260mg). Os extratos concentrados foram mantidos sob refrigeração a 4 °C até a realização do ensaio de citotoxicidade contra linhagens de células cancerosas.

LINHAGENS CELULARES

Os extratos brutos metanólicos foram avaliados quanto ao efeito citotóxico contra células humanas cancerosas de três linhagens: SK-MEL-19 (melanoma), ACP03 (carcinoma gástrico) e HCT-116 (carcinoma colorretal). As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (volume de 50mL para células aderidas), utilizando meio de cultura RPMI-1640, suplementado com glutamina 2mM, 10% de soro fetal bovino, 100mg de estreptomicina/mL e 100U/mL de penicilina, incubadas em estufa a 37°C com parâmetros controlados de

umidade, temperatura e com uma atmosfera de 5% de CO₂.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO

O teste usado para avaliar o efeito citotóxico foi o ensaio do MTT, que corresponde a uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pela atividade de algumas enzimas, como a succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (MOSMANN, 1983).

O procedimento experimental consistiu em plaquear poços de uma placa na densidade de 10⁵ células/mL, com os extratos em uma concentração única de 50µg/mL em triplicata. Como controle positivo foi usada a droga doxorubicina 10µM. Após 72 horas de incubação, os extratos contidos nas placas tiveram o seu sobrenadante aspirado. Cada poço recebeu 200µL da solução de MTT a 0,5mg/mL e as placas foram reincubadas por mais 3 horas nas mesmas condições do cultivo de células. Em seguida, o

sobrenadante dos poços foi aspirado e o precipitado ressuspendido em 150µL de DMSO por cerca de 10 minutos até sua completa dissolução. Para a quantificação do sal reduzido pelas mitocôndrias das células vivas, as absorbâncias foram lidas com auxílio de um espectrofotômetro de placas, em um comprimento de onda de 595nm. Os dados obtidos foram analisados pelo programa GraphPadPrism 4.0 (Intuitive Software for Science) e representados como porcentagem de inibição de crescimento celular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exploração dos metabólitos secundários de organismos vivos é certamente um aspecto de incontestável valor para a ciência, por suas aplicações farmacológicas diretas, como protótipos de novos fármacos ou como instrumentação científica. Neste trabalho foi possível demonstrar a ação de extratos brutos metanólicos obtidos do molusco *Neritina zebra* frente às linhagens SK-MEL-19, ACP03 e HCT-116. Os resultados do teste de citotoxicidade são apresentados na tabela 1, podendo-se observar que os extratos de *Neritina zebra* apresentaram baixa

atividade contra as células das três linhagens. Mesmo o melhor rendimento encontrado (12,49% de inibição do extrato N1 contra a linhagem gástrica ACP03) ainda é muito baixo para criar expectativas na obtenção de um composto antitumor

ou justificar o estudo químico desse extrato. Por outro lado, como era de se esperar, a elevada atividade citotóxica da doxorrubicina foi confirmada, assumindo nesse bioensaio percentuais de inibição de crescimento em torno de 80%.

Tabela 1. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos brutos de *Neritina zebra* contra três linhagens de células cancerosas.

Amostra		SK-MEL-19		ACP03		HCT-116	
Nº	Identificação	IC (média)	DP	IC (média)	DP	IC (média)	DP
1	N1	-12,91%	12,43%	12,49%	0,05%	1,59%	5,79%
2	N2	-17,41%	6,76%	5,43%	1,22%	-1,57%	5,25%
3	DOXO	77,76%	1,93%	80,89%	4,82%	80,02%	0,66%

N1: Extrato obtido de animais com concha; N2: Extrato obtido de animais sem concha; DOXO: Doxorrubicina 10µM (controle positivo); IC: Inibição de crescimento; DP: Desvio padrão.

Embora os extratos metanólicos de *Neritina zebra* não tenham apresentado efeito citotóxico significativo, existem evidências na literatura de moluscos dos quais foram isolados produtos naturais anticâncer. No molusco *Dolabella auricularia*, por exemplo, são encontradas pequenas quantidades de peptídeos da classeda dolastatinas, que agem em diversos tipos de células tumorais. A partir de um estudo estrutura-atividade, foi desenvolvida uma série de análogos com o objetivo de manter ou melhorar a citotoxicidade e reduzir efeitos colaterais. Um desses análogos sintéticos é o TZT-1027, também conhecido por soblidotina, já licenciado

pela empresa japonesa DaiichiPharmaceuticals (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009).

Finalmente, um resultado bastante curioso no presente estudo foi observado frente à linhagem de melanoma (SK-MEL-19). Os valores negativos (-12,91% para N1 e -17,41% para N2) nas médias de inibição de crescimento, embora sejam pequenos, sugerem que as células SK-MEL-19, ao serem expostas aos dois extratos de *Neritina zebra*, reproduziram ainda mais do que quando não expostas a qualquer tratamento.

CONCLUSÃO

Os extratos brutos metanólicos obtidos de *Neritina zebra* não apresentaram atividade citotóxica significativa contra as linhagens SK-MEL-19, ACP03 e HCT-116. Deve-se ainda ressaltar um aspecto interessante, que é a possibilidade de trabalhos futuros utilizarem diferentes solventes, como acetato de etila e hexano, ampliando o espectro de polaridade e, por consequência, a variedade de moléculas obtidas nos extratos a serem testados em bioensaios semelhantes.

AGRADECIMENTO

A primeira autora agradece pelo apoio financeiro recebido na forma de bolsa de Iniciação Científica do IFPA – *Campus* Belém, por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, Tecnológica e de Inovação (PIBICTI), Edital 003/2012-DPPI, vinculado ao Projeto intitulado “Estudo do potencial anticâncer de substâncias obtidas do molusco *Neritina* sp. (*Gastropoda: Neritidae*) encontrado em ecossistemas paraenses”.

REFERÊNCIAS

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63. 1983.

MUNRO, I.C.; KENNEPOHL, E.; KROES, R. A procedure for the safety evaluation of flavouring substances. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 207–232, 1999.

RADJASA, O.K.; VASKE, Y.M.; NAVARR O, G.; VERVOORT, H.C.; TENNEY, K.; LINGINGTON, R.G.; CREWS, P. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 6658-6674, 2011.

ROCHA, C.A.M. **As Pernas do Caranguejo**: cancer cura. 1 ed. Belém, 2013.

TEIXEIRA, V.L. Produtos Naturais Marinhos. In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. (Org.). **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 443-471, 2009.