

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

**ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTINEOPLÁSICA EM  
TUMORES EXPERIMENTAIS ATRAVÉS DA ASSOCIAÇÃO  
IMUNOPARVUM® COM *Cissus verticillata*(L.) Nicolson D.H e Jarvis C.**

**ALUNA: Flávia Raquel Santos Lucena**

**ORIENTADORA: Professora Dra. Silene Carneiro do Nascimento  
CO-ORIENTADOR: Professor Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida**

**RECIFE  
2006**

## 1.0 APRESENTAÇÃO DO TEMA

O câncer é uma doença de alta frequência, afetando boa parte da população do mundo, sendo a segunda causa de morte em países desenvolvidos. Em geral, um tumor é iniciado quando uma célula normal do organismo sofre alterações em genes relacionadas com o controle de proliferação celular (GOMES.,1997).

A procura por produtos naturais para o desenvolvimento de novas drogas é importante. As plantas são um verdadeiro laboratório onde se sintetizam substâncias que podem ter efeito tanto benéfico como maléfico para o organismo humano. A utilização das mesmas pode ser a princípio mais aceita do que a alopatia, mas precisa haver um conhecimento prévio dos componentes dessas plantas, pois a presença de inúmeras substâncias nelas contidas pode produzir efeitos, principalmente quando tomadas em longo prazo (ALMEIDA.,1993).

Entre as espécies vegetais, conhecidas pelos seus usos medicinais, podemos citar *Cissus sicyoides* L. hoje denominado *Cissus verticillata* (L.) Nicolson e. Jarvis pertencente à família das Vitaceae é conhecida popularmente como insulina, cipó-pucá, bejuco de porra, bejuco-caro, puci, cortina-japonesa, uva brava e anil trepador (BELTRAME et al.,2001; BELTRAME et al.,2002; ALMEIDA.,1993; SILVA et al., 1996).

No Brasil, *Cissus verticillata* é utilizada pela medicina popular em diversas doenças, como a epilepsia, derrame cerebral, abscessos e no tratamento de diabetes mellitus do tipo 2, atividades antiinflamatórias e anti-reumáticas também são atribuídas à planta (MORI et al., 2001; VIANA et al., 2004), o chá das partes aéreas é utilizado como, anti-reumático, antiepilético, anti-hipertensivo, antitérmico e antidiabético (SILVA et al., 1996). Em uma recente pesquisa (GARCIA et al., 2000), o extrato aquoso de *Cissus verticillata* mostrou uns efeitos antiinflamatórios, determinado em um modelo de carragenina induzindo edema de patas em ratos (modelo para inflamação geral), e em edemas de orelhas de camundongos (modelo para inflamação tópica). Estes autores também observaram uma diminuição no nível de mieloperoxidase em amostras teciduais da área inflamada. SAENZ et al. (2000) demonstraram uma atividade citotóxica do extrato de *Cissus Verticillata*, bem como uma atividade antitumoral para a espécie *Cissus quadrangularis* foi demonstrada por OPOKU et al (2000). Sua atividade analgésica central também foi demonstrada por ALMEIDA et al (2006).

A quimioterapia é utilizada em tratamento sistêmico, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (CARVALHO et al., 2003).

O tratamento de pacientes com câncer conta com uma alternativa: a imunopotencialização do hospedeiro. Este tratamento é conhecido como imunoterapia adjuvante. O Imunoparvum® é amplamente utilizado como imunomodulador, envasado em ampolas contendo 2mg/ml de *Propionibacterium acnes* (antigo *Corynebacterium parvum*), sendo indicado para diversas condições patológicas de importância clínica. Não se sabe ainda qual o papel exato de adjuvantes na terapêutica do câncer, mas, sabe-se que os adjuvantes causam a estimulação do sistema retículo-endotelial (RODRIGUES et al, 2002).

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Estudo da atividade citotóxica e antineoplásica nos tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich através da associação Imunoparvum® com *Cissus verticillata*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estudar a citotoxicidade em linhagens de células de câncer humano (KB, HEP-2, NCI-H292).
- Avaliar a atividade antineoplásica do *Cissus verticillata* nos tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich.
- Tratar camundongos portadores de tumores com a associação do *Cissus verticillata* e Imunoparvum® para verificar a atividade antitumoral.

## **3.0 MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **Animais**

Serão utilizados uns totais de 144 camundongos albinos suíços, sendo 72 portadores do Sarcoma 180 e 72 portadores do Carcinoma de Ehrlich. Os animais serão divididos, para cada tipo de tumor, em grupos. Cada experimento será repetido três vezes.

### **Sarcoma 180:**

• G1 - Controle (n= 6); G2 – Tratar previamente com Imunoparvum® e após 24 horas do implante tumoral tratar com *Cissus verticillata* (n=6); G3 – Tratar após 24 horas do implante tumoral com *Cissus verticillata* (n= 6); G4 Tratar 24 horas após o implante tumoral com a associação Imunoparvum® mais *Cissus verticillata* (n= 6). Todas as administrações serão feitas por via intraperitoneal.

**Total de animais:** 24 (vezes três experimentos) 72 animais.

### **Carcinoma de Ehrlich:**

• G1 - Controle (n= 6); G2 – Tratar previamente com Imunoparvum® e após 24 horas do implante tumoral tratar com *Cissus verticillata* (n=6); G3 – Tratar após 24 horas do implante tumoral com *Cissus verticillata* (n= 6); G4 Tratar 24 horas após o implante tumoral com a associação Imunoparvum® mais *Cissus verticillata* (n= 6).

**Total de animais:** 24 (vezes três experimentos) 72 animais.

### **Avaliação da atividade antitumoral**

Os animais serão divididos em grupo onde o primeiro grupo (G2) receberá um tratamento com Imunoparvum® duas vezes por semana durante uma semana na dosagem de 0,2 mg/ml antes da implantação do tumor, esses mesmos animais receberão o *Cissus verticillata* 24 horas após a implantação do tumor nas doses de 600mg/kg por 7 dias consecutivos. O grupo (G3) tratado por *Cissus verticillata* dosagem de 600mg/kg e ainda um terceiro (G4) grupo que será tratado com a associação *Cissus verticillata* (600mg/kg) por sete dias mais Imunoparvum® (0,2mg/ml), duas vezes semanais.

Será utilizado tumor ascítico, removido do animal doador, diluído (100 vezes) em solução salina e então, uma suspensão equivalente a  $5 \times 10^6$  células/ml, será injetada na região axilar direita de animais sadios.

As doses do produto teste foram baseadas na  $DL_{50}$  referida por Almeida *et al.*, 2006 para *Cissus verticillata* e em doses utilizadas por Rodrigues, *et al.*, 2002 para Imunoparvum®.

Ao término do tratamento, os tumores serão removidos e pesados para avaliação da inibição tumoral. O mesmo será adotado para os animais controles. A inibição tumoral será calculada segundo a fórmula:  $TWI (\%) = C - T / C \times 100$ , onde TWI (%) = percentual de inibição do peso tumoral; C = média do peso dos tumores do grupo controle; T = média do peso dos tumores tratados (GERAN *et al.*, 1972).

### **Avaliação da atividade citotóxica**

As células HEp-2, KB e NCI-H292 serão mantidas em DMEM - Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200mM. (EAGLE,1959).

Para determinação da citotoxicidade uma suspensão celular de  $10^5$  células/mL, será preparada em meio DMEM - Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/ml + estreptomicina 250 mg/ml) e 1% de L-glutamina 200mM. adaptado para a linhagem celular. A suspensão será distribuída em placas de cultura com 96 poços (225µl em cada poço). As placas serão incubadas a 37°C em estufa (Sedas, Milão-Itália), com atmosfera húmida enriquecida CO<sub>2</sub>. Após 24h as substâncias testes serão adicionadas (25 µl/poço) e as placas serão reincubadas a 37°C (COSTA & NASCIMENTO., 2003).

A avaliação da atividade citotóxica será realizada através do método MTT brometo (3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) a uma concentração de 5mg/ml em PBS. As placas serão deixadas por duas horas em estufa (37°C). Ao final desse período o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT serão aspirados e em seguida, 100 µl de DMSO será adicionado a cada poço para dissolução dos cristais Formazan (MOSMANN,1983 ; ALLEY *et al.*,1988). A leitura óptica será feita em leitor automático de placas do tipo Multiskan a 540nm.

A  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle) será determinada a partir da regressão linear, onde será relacionado o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas admitindo-se um intervalo de confiança de 99% ( $p < 0,01$ ), para a reta obtida. (Costa & Nascimento, 2003).

### **JUSTIFICATIVA:**

Nos últimos anos a pesquisa por agentes antitumorais eficazes para substituir os medicamentos que não fazem mais efeitos em alguns tipos de tumores, como o tumor de mama, de próstata, entre outros, faz com que novas drogas sejam estudadas. O *Cissus verticillata* tem se mostrado eficiente no tratamento de várias patologias, tendo a espécie *Cissus quadrangularis* apresentado atividade antitumoral, a associação do *Cissus verticillata* com Imunoparvum, droga que aumenta a resposta imunológica, denominada adjuvante, poderá potencializar a resposta antitumoral. Espera-se com esta associação encontrar melhores resultados da ação antitumoral, bem como aumentar a resistência imunológica do portador de câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alley, M C.; Scudiero, D A.; Monks, A.; Hursey, M L.; Czerwinski, M J.; Fine, D L.; Abbot, B J.; Mayo, J G.; Shoemaker, R H.; Boyd, M R. *Cancer Res.* 1988, 48, 589.

ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras: conhecimentos populares e científicos**, Ed. Hemus.p 342, 1993.

ALMEIDA, Edvaldo R. ; LUCENA, Flávia F.R.; OLIVEIRA, João R.G. ; SOARES, Renata P.F.; COULTO, Geraldo G.B.L. / Central Antinociceptive Effects of *Cissus sicyoides* on Mice / **Pharmaceutical Biology** /2006/ 44/ 4 /304-308

BELTRAME, F.L., SARTORETTO, J.L., BAZOTTE, R.B., CUMAN, R.N., CORTEZ, D.A.G.- Estudo Fitoquímico e avaliação antidiabética do *Cissus sicyoides*. **Química Nova**, São Paulo. v. 24, n. 6, p. 783 – 785, 2001.

BELTRAME, F.L.; PESSINE, G.L.; DORO, D.L.; FILHO, B.P.D.; BAZOTTE, R.B.; CORTEZ, D.A.G. Evaluation of antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 21-25, Mar. 2002.

CARVALHO, P. *et al.* Surfing on microtubule ends. *Trends Cell. Biol.* 5, 229, 2003.

COSTA, M.C.C.D.; NASCIMENTO, S.C. – Atividade citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, V22, n.2, p.155-158,2003.

EAGLE H. *Science*, 1959, 174, 500.

GARCÍA, M.D.; QUILEZ, A.M.; SAENZ, M.T.; MARTINEZ-DOMINGUES, M.E.; DE LA PUERTA, R. Anti-Inflammatory activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*., species used in the Caribbean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 71, n. 3, p. 395 – 400, 2000.

Geran RI, Greenberg NH, Macdonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems, 3<sup>rd</sup> edition. *Cancer Chemother Rep* 3:1 - 103.

GOMES, R. Câncer da mama. In: Oncologia Básica. GOMES, R. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 1997.

MORI, T.; NISHIKAWA, Y.; TAKATA, Y.; KASHIUCHI, N.; ISHIHARA, N. Effect of Insulina leaf extract on development of diabetes- Compararison between normal, Streptozotocin-induced diabetic rats and hereditary diabetic mice. **Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science**, Toquio, v. 54, p. 197 - 203, 2001.

Mosmann, T. *J. Immunol. Methods*, 1983, 65, 55.

NICOLSON, D.H. & JARVIS, C. 1984. *Cissus verticillata*, a new combination for *C. sicyoides* (Vitaceae). *Taxon* 33: 726-727.

Opoku,A.R; Geheeb-Keller,M; Lin,J.; Terblanche, S.E; Hutchings,A.;Chuturgoon, A.; Pillay, D.- Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plantas for antineoplastic activities versus the HepG2 cell line- **Phytother Res**; v.14. n.7 , p. 534-537, 2000.

RODRIGUES, G.O. *et al.* Lyophilization of Imunoparvum® as na alternative to reduce its side-effects. *Rev. Ciências Exatas e Naturais*, v. 04. n. 01, 73-78, 2002.

SÁENZ M.T. *et al.*, - Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. Vitaceae). **Phytherapy Research**. v. 14, n. 7, p. 552-554, 2000.

SILVA, G.A.; MURADIN, L.B.A.; AKISUE, G.; FERRO, V;O. Padronização dos extratos de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal) e identificação de carotenos **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.5,n.1, p.96-112, 1996.

VIANA, G.S.B.; MEDEIROS,A.C.C.; LACERDA,A.M.R.; LEAL,L.K.A.M.; VALE,T.G.; MATOS,F.J.A. Hipoglycemic and anti-lipemic effects of the aquos extract from *Cissus sicyoides*. **Biomed Central Pharmacology**. Disponível em: <[www.biomedcentral.com](http://www.biomedcentral.com)>. Acesso em:27 jun. 2004.