



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB
FACULDADE DA CEILÂNDIA - FCE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

SUELLEN DA COSTA E SILVA

RESPOSTA DAS CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA HUMANO Saos - 2 AO
EXTRATO DA FOLHA DE *Morus nigra*

Brasília – DF

2016

SUELLEN DA COSTA E SILVA

RESPOSTA DAS CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA HUMANO Saos - 2 AO
EXTRATO DA FOLHA DE *Morus nigra*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial para a
obtenção do grau de bacharelado em
Farmácia, na Universidade de Brasília.

Dra. Loise Pedrosa Salles
Universidade de Brasília
Orientadora

Brasília – DF

2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB
FACULDADE DA CEILÂNDIA - FCE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

SUELLEN DA COSTA E SILVA

RESPOSTA DAS CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA HUMANO Saos - 2 AO
EXTRATO DA FOLHA DE *Morus nigra*

Orientadora: Dra. Loise Pedrosa Salles
Co-orientadora: Dra. Danielle Kaiser De Souza

Brasília – DF

Julho de 2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Faculdade da Ceilândia

Universidade de Brasília.

E silva, Suellen da Costa.

RESPOSTA DAS CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA HUMANO Saos - 2 AO
EXTRATO DA FOLHA DE *Morus nigra* / Suellen da Costa e Silva

Orientadora Dra. Loise Pedrosa Salles - Brasília, 2016.

Co-orientadora: Dra. Danielle Kaiser De Souza – 2016.

Trabalho de conclusão de curso de Farmácia, Faculdade da Ceilândia .

34 folhas.

Universidade de Brasília, 2014.

“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.

Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Dedico o meu trabalho
À minha família, e a todas as pessoas
que me auxiliaram nessa jornada...

Agradecimentos

A professora doutora Loise Pedrosa Salles e a professora doutora Danielle Kaiser de Souza, desejo expressar os meus agradecimentos pela sua orientação, pela amizade, simpatia e por toda a paciência que sempre teve comigo. Serei eternamente agradecida por tudo.

Ao grupo de pesquisa “Desenvolvimento e Controle da Qualidade de Fármacos e Medicamentos”, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sob a coordenação da Profa. Dâmaris Silveira por ter fornecido o extrato de *Morus nigra*.

Ao Samuel O’ Donnell pela dedicação e ajuda em todos os momentos no laboratório, muito obrigada!

Agradeço aos meus colegas de trabalho do hospital das forças armadas pela paciência e ajuda nessa trajetória.

Aos meus colegas do laboratório de biotecnologia da Universidade de Brasília, pela dedicação e projetos realizados.

A minha família que constituiu o meu maior apoio neste período, principalmente meus pais, Maria Inês e Jose Maria pela compreensão e ajuda nos momentos difíceis e ao meus amigos que caminharam junto comigo.

1 Sumário

Lista de figuras	8
Lista de tabelas	8
RESUMO	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. <i>Morus nigra</i>	12
1.2. Processo de apoptose.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVO	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1. Exposição ao extrato de <i>Morus nigra</i>	18
4.2. Cultura de células	18
4.3. Teste de viabilidade.....	19
4.4. Extração de RNA total.....	20
4.5. Síntese do DNA complementar (cDNA)	21
4.6. PCR real time (qPCR)	22
4.7. Análise estatística.....	23
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	26
4. CONCLUSÃO	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

Lista de figuras

Figura 1. Aspecto da <i>Morus nigra</i> L. em período de frutificação.	13
Figura 2. Visão geral esquemática das vias de apoptose celular (Figura obtida no site: http://www.cellsignal.com/pathways/apoptosis-signaling.jsp)	16
Figura 3. células na câmara de Neubauer com o corante azul de tripan nos grupos tratados com extrato da folha de amora a A é 25 µg/mL e B é 50 µg/mL, C é o grupo controle e D é o grupo com metanol 1% em cultura de 5 dias.	20
Figura 4. Gráfico de viabilidade celular de Saos-2. Metanol, células expostas a metanol 1%; EXT 25, extrato de M nigra 25 µg/mL; EXT 50, extrato de M nigra 50 µg/mL; EXT 100; extrato de M nigra 100 µg/mL; EXT 300, extrato de M nigra 300 µg/mL; grupo controle, células não expostas. (n= 3/grupo)	24
Figura 5. Níveis de expressão de mRNA de BAX em Saos-2 expostas a extrato de <i>Morus nigra</i> . Exposição das células Saos – 2 ao extrato nas concentrações de 25 µg/mL (EXT 25) e 100 µg/mL (EXT 100), grupo controle de células não expostas e grupo com 30 µL de metanol a 1%. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Anova, Bonferroni post-test, p<0.05).....	25
Figura 6. Níveis de expressão de mRNA de BCL2 em Saos-2 expostas a extrato de <i>Morus nigra</i> . Exposição das células Saos – 2 ao extrato nas concentrações de 25 µg/mL (EXT 25) e 100 µg/mL(EXT 100), grupo controle de células não expostas e grupo com 30 µL de metanol a 1%. Letras diferentes representam estatísticas significativas (Anova, Bonferroni post-test, p<0.05) (n= 3/grupo)	26
Figura 7 O processo apoptótico envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.	27

Lista de tabelas

Tabela 1. Desenhos dos primers e cada transcrito da espécie <i>Homo sapiens</i>	22
--	----

RESUMO

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno primário que afeta principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens com ocorrência de mutações na proteína p53. A pesquisa por novos agentes anticâncer de fontes naturais tem obtido sucesso em todo o mundo; trabalhos recentes demonstram que os flavonoides têm o efeito anticancerígeno e atividade antiploriferativa. As plantas pertencentes ao gênero *Morus* apresentam grande quantidade de flavonoides, sendo amplamente utilizadas todas as partes da planta na medicina popular. Este estudo tem por objetivo avaliar o efeito do extrato da folha de *Morus nigra*, na expressão dos genes relacionados à apoptose BCL2 e BAX em células de osteossarcoma humano (Saos-2). As células foram expostas ao extrato de *M. nigra* diluído em metanol a 1% em concentrações variadas para o teste de viabilidade realizado com azul de tripan, durante um e cinco dias. Após cultivo de um dia na presença do extrato nas concentrações de 25 µg/mL, 100 µg/mL, 30 µL de metanol a 1% e não expostas a nenhum extrato constituíram o grupo controle. As células foram coletadas e a extração de RNA total foi realizada segundo o protocolo do Trizol Plus. O RNA obtido foi submetido a síntese de cDNA e o PCR *real time* com os *primers* dos genes BAX e BCL2. O teste de viabilidade demonstrou citotoxicidade no grupo de 300 µg/mL e uma viabilidade celular de 70% no grupo de 100 µg/mL em um dia de exposição. No cultivo de 5 dias, houve citotoxicidade nos grupos do extrato de 100 µg/mL e 300 µg/mL e uma viabilidade de aproximadamente 60% no grupo 50 µg/mL. A expressão gênica de BAX apresentou diferença estatística significativa no grupo tratado com 25 µg/mL do extrato de *M. nigra* em relação aos outros grupos, com superexpressão desse gene. O grupo tratado com 100 µg/mL do extrato de *M. nigra* apresentou superexpressão de BCL2 em relação aos outros grupos. O aumento da expressão de BAX e BCL2 demonstra que o extrato de *M. nigra* é capaz de ativar as vias de apoptose. A citotoxicidade deu-se de forma dose e tempo dependentes.

Palavras-chave: Amora. *Morus*. Osteossarcoma. Saos2.

ABSTRACT

Osteosarcoma is a primary malignant bone tumor that mainly affects children, adolescents and young adults with the occurrence of mutations in the p53 protein. The research for new natural sources with anticancer agents have been successful throughout the world, recent studies demonstrate that flavonoids have anticancer effect and nonproliferation activity. The plants belonging to the genus *Morus* present great amount of flavonoids, being widely used all parts of the plant in folk medicine. This study aims to evaluate the effect of *Morus nigra* leaf extract, the expression of apoptosis related genes BCL2 and BAX in human osteosarcoma cells (Saos-2). Cells were exposed to *M. nigra* extract diluted in 1% methanol in varying concentrations for the viability test with trypan blue for one to five days. After cultivating a day in the presence of the extract at concentrations of 25 µg/mL, 100 µg/mL, 30 µL of methanol 1% and not exposed to any statement constituted the control group. The cells were collected and total RNA extraction was performed according to the protocol of TRIzol Plus. The obtained RNA was subjected to cDNA synthesis and real-time PCR with primers of BCL2 and BAX. The cytotoxicity demonstrated viability test in the group of 300 µg/mL and cell viability of 70% in the group of 100 µg/mL in a day of exposure. At 5 days in culture, the cytotoxicity was groups extract 100 µg/mL and 300 µg/mL and a viability of approximately 60% in group 50 µg/mL. The gene expression BAX showed statistically significant difference in the group treated with 25 µg/mL of *M. nigra* extract in the other groups, with overexpression of this gene. The group treated with 100 µg/mL *M. nigra* extract showed overexpression of BCL2 in relation to the other groups. The increase in the BAX BCL2 expression and demonstrates that *M. nigra* extract can active the apoptosis pathways. Cytotoxicity was given dose and time dependent manner.

Keywords: Amora. *Morus*. Osteosarcoma. Saos-2.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Osteossarcoma

O câncer ósseo primário é um tumor maligno que afeta principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens (VISVADER e LINDEMAN, 2008), é pouco frequente, mesmo assim surgem no Brasil aproximadamente 2.700 casos novos por ano. Os tipos mais frequentes desses tumores são: osteossarcoma, tumor de Ewing e condrossarcoma (SBC). No osteossarcoma o sintoma mais comum é a dor, que no início é intermitente e de leve intensidade, tornando-se contínua e intensa com o decorrer do tempo a consequência mais comum é a fratura patológica devido ao aumento do tecido osso deixando o osso mais sensível. A ocorrência de mutações na proteína p53 conduzem à desregulação de mecanismos apoptóticos, ativação de oncogenes e propagação de mutações genéticas (TA et al., 2009). Com a introdução de novas abordagens terapêuticas, que incluem quimioterapia pré-operatória, cirurgia e quimioterapia pós-operatória, a taxa de sobrevida aumenta. Mas ainda a chance do desenvolvimento de metástase é grande devido ao desenvolvimento de resistência à terapia e a qualidade de vida do paciente se torna mais difícil pelas amputações recorrentes (PICCI, 2007). Existem protocolos de tratamento nos quais os quimioterápicos mais usados para esse tipo de tumor são a doxorrubicina (DOX), cisplatina (CIS) e o metotrexato (MTX) (BIELACK et al., 2002; JAFFE e GORLICK, 2008).

Os medicamentos contra o câncer têm o mecanismo dirigido para alvos moleculares e a principal característica é a indução da apoptose, o desenvolvimento de drogas e a concepção de protocolos de tratamento que utilizam múltiplas vias bioquímicas envolvidas no processo pode minimizar os danos causados por esse tipo de câncer (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Recentemente a pesquisa por novos agentes anticâncer de fontes naturais tem obtido sucesso em todo o mundo. Nas últimas décadas a descoberta de drogas tem sido dirigida para agentes que possam prevenir ou tratar o câncer, aliados conhecimento etnofarmacológico com a busca por plantas com potenciais atividades citotóxicas (GÁLVEZ *et al.*, 2003).

Os flavonóides compreendem mais de 4000 estruturas que podem possuir efeitos farmacológicos, sendo amplamente investigado o efeito anticancerígeno, por possuírem atividade antiploriferativa (MOGHADDAM ET AL., 2012). Os benefícios

para a saúde de uma dieta rica em vegetal são há muito conhecidas, com alimentos ricos em flavona sugerindo ação protetora contra o desenvolvimento de aterosclerose e demência, além de agir como anti-inflamatórios e potenciais antioxidantes, inibindo várias cascatas de sinalização pró-inflamatória (LUCAS et al., 2013).

As plantas pertencentes ao gênero *Morus* (*Moraceae*) apresentam grande quantidade de flavonoides com muitas propriedades medicinais relatadas na literatura científica. Os frutos de amoreira podem ser usados como remédio para a disenteria, como anti-helmíntico e expectorante. Há relatos dos frutos da amoreira preta serem utilizados com sucesso para o tratamento de lesões na boca (ERCISLI e ORHAN, 2008; OZGEN et al., 2009).

1.2. *Morus nigra* L.

O gênero *Morus* é constituído de aproximadamente 24 espécies, sendo as mais importantes *Morus alba*, *Morus rubra* e *Morus nigra* (OZGEN et al., 2009). A família das *Moraceae* tem sua origem na Ásia, onde é extremamente usada na medicina popular, principalmente a chinesa. Além dos frutos serem consumidos como uma fruta fresca ou sob a forma de produtos de confeitaria, tais como compotas, geleias, sobremesas, suco, pasta e sorvetes (OZGEN et al., 2009; PADILHA et al., 2010).

Amoras são encontradas a partir de clima temperado para regiões subtropicais e estando plenamente climatizada no Brasil a árvore pode medir até 9m de altura, apresentando folhas ovaladas, flores monoicas ou dioicas e frutos de coloração roxa a preta (figura1) no estágio máximo de maturação. O fruto pode medir até 2,5cm e apresenta sabor levemente ácido (ÖZGEN et al., 2009).



Figura 1. Aspecto da *Morus nigra* L. em período de frutificação.

Há um grande interesse no estudo estrutural e farmacológico dos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides que são encontrados em várias espécies da família *Moraceae*. A maioria dos estudos fitoquímicos realizados com *M. nigra* estão voltados aos frutos, como no estudo de OZGEN et al., 2009. Os frutos da amora preta apresentaram as maiores médias de fenóis totais, antocianinas monoméricas e atividade antioxidante. Em média, a *M. rubra* teve 42% menos do que o conteúdo de fenóis totais da *M. nigra*. A antocianina é um composto que pode ter efeitos potencialmente benéficos, incluindo a redução do risco de doenças cardiovasculares e cânceros com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, e quimioprotectoras (ARAMWIT et al., 2010; ÖZGEN et al., 2009; BAEA e SUH, 2006). Além disso apresentaram efeito inibitório sobre a migração e a invasão de uma linhagem celular de cancro de pulmão humano (CHEN et al., 2006).

As folhas possuem uma grande importância econômica, por serem utilizadas como alimento para o bicho da seda, na região da Turquia, (ARAMWIT et al., 2010). Sob o ponto de vista etnobotânico, as folhas tem mostrado possuir ação diurética, hipoglicemiante, atividades hipotensoras e estão sendo usadas para o tratamento do climatério, sendo o último justificado pela quantidade de diferentes flavonoides, que possuem efeito fitoestrogênico. A casca da raiz de amoreiras também tem sido muito utilizado como anti-inflamatório, antitússígeno e antipiréticos (PAWLOWSKA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013). O extrato da raiz possui oxiresveratrol que como outros fitoquímicos pode contribuir para a forte atividade inibitória tirosinase (ZHENG et al., 2010).

Na medicina popular, as folhas da amoreira preta têm sido amplamente usadas por mulheres durante a menopausa, como repositor hormonal, aliviando seus sintomas principalmente os fogachos e amenizando os sintomas de cefaleia e irritação. No estudo de Oliveira et al. em 2013, que avaliava a toxicidade do chá da folha da amoreira preta, não houve risco da ingestão sub crônica em ratos. Os autores concluíram que o chá das folhas de *Morus nigra* é de baixa toxicidade (OLIVEIRA et al., 2013).

As folhas dessas espécies são consumidas no Japão e Coreia como agentes anti-hiperglicêmicos por pacientes com diabetes mellitus, devido à presença da 1-desoxinojirimicina, que é conhecida como um dos mais potentes inibidores da α -glicosidase (PADILHA et al., 2010). Entretanto, no estudo realizado por Volpato et al em 2011, verificou-se que não houve redução de níveis glicêmicos em ratas grávidas com diabetes induzida. Ocasionalmente, os fetos de ratas diabéticas expostas ao extrato de *Morus nigra* tiveram menor incidência de anomalias esqueléticas em relação ao grupo diabético não exposto ao extrato, principalmente foram diminuídas as anomalias viscerais. Outro ponto positivo avaliado, foi a redução nos níveis de colesterol, triglicerídeos e os níveis de VLDL em ratas diabéticas em comparação com ratas não diabéticas (VOLPATO et al., 2011). Em outro estudo realizado por Padilha et al em 2009 e 2010, o extrato apresentou efeito analgésico potente, tanto nos modelos de rato nociceptivas viscerais e central (PADILHA et al., 2009; PADILHA et al., 2010).

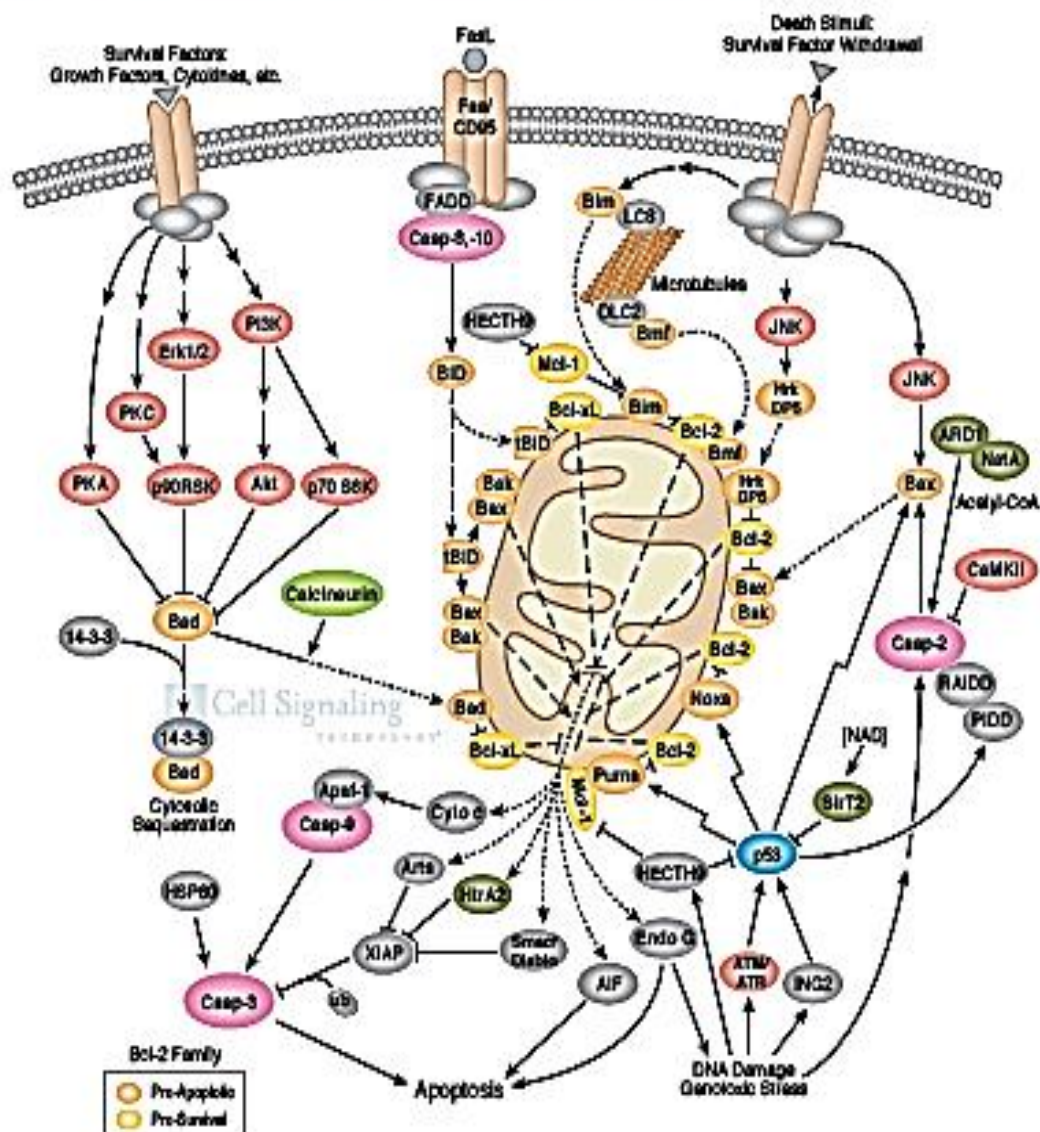
1.3. Processo de apoptose

A morte celular é um elemento essencial do funcionamento de organismos multicelulares. A apoptose é um processo fisiológico de morte celular altamente regulado e dependente de energia. Ocorre tanto em tecidos normais como em tecidos patológicos, eliminando células danificadas ou em excesso no organismo, sem danificar células e tecidos adjacentes.

A via mitocondrial da apoptose é controlada pela família das proteínas BCL2 (“B-cell lymphoma protein 2”) que também controlam a via extrínseca do receptor da morte celular (figura 2). O BCL2 é um proto-oncogene que produz a proteína BCL2, cuja função biológica é a de suprimir a morte celular programada, induzida por vários estímulos. Foram identificadas mais de duas dúzias de proteínas da família BCL2 (LAURICELLA et al., 2003; ELISEEV et al., 2008).

BAX (proteína X associada à família BCL2) é uma proteína com efeitos pró-apoptótico. Originalmente, da família de proteínas que promovem apoptose atuando na mitocôndria (DU et al., 2014). Em células que estão sofrendo apoptose, a forma ativa de BAX acumula-se na membrana mitocondrial externa e isso resulta na permeabilização da membrana mitocondrial, com liberação de citocromo c e outras moléculas pró-apoptóticas, promovendo morte celular apoptótica (LAURICELLA et al., 2003; MEÇA et al., 2010).

Mitochondrial Control of Apoptosis



Pathway Diagram Keys

Kinase	Enzyme	G-protein	Direct Inhibitory Modification	Transcriptional Inhibitory Modification	Prominence
Phosphatase	Pro-Apoptotic	Adaptor	Multiple Stimulatory Modification	Separation of Subunits or Cleavage Products	Transcriptional Stimulatory Modification
Transcription Factor	Pro-Survival	Co-receptor	Multiple Inhibitory Modification	Joining of Subunits	Transcriptional Inhibitory Modification
Caspase	GAP/GTP	Ribosomal subunit	Positive Stimulatory Modification		
Receptor	GTPase	Unribosomal subunit			

Figura 2. Visão geral esquemática das vias de apoptose celular (Figura obtida no site: <http://www.cellsignal.com/pathways/apoptosis-signaling.jsp>)

2. JUSTIFICATIVA

Câncer é o crescimento das células normais que evoluem para um estado neoplásico, que podem invadir e se espalhar para locais distantes do corpo, podendo ter consequências graves para a saúde (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). É uma das principais causas de morte, segundo o último censo realizado em 2010 a quantidade de óbitos específicos por neoplasias malignas e de 169.571 (IBGE/Diretoria de Pesquisas).

Em geral, o tabagismo, hábitos alimentares e comportamentos reprodutivos são os principais fatores de risco para o câncer, além de agentes infecciosos (JEMAL et al., 2010).

Os avanços no conhecimento da Biologia Molecular têm proporcionado melhor entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação e a diferenciação celular, bem como o desenvolvimento de metástases tumorais. A utilização dos marcadores de viabilidade celular proporcionam um padrão de avaliação do comportamento de células cancerígenas.

O osteossarcoma atinge frequentemente crianças e pessoas jovens, que são muitas vezes submetidos à cirurgia radical seguido de tratamentos quimioterapêuticos bastantes agressivos. A busca de novos fármacos principalmente de origem vegetal tem ocorrido em todo o mundo e se faz necessária devido à resistência aos quimioterápicos já utilizados.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato da folha de *Morus nigra*, na expressão dos genes relacionados à apoptose BCL2 e BAX, em células de linhagem tumoral de osteossarcoma humano Saos-2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Exposição ao extrato de *Morus nigra*

O extrato etanólico da folha de *M. nigra* com o código de exsicata Fagg CW 2302 foi doado pelo grupo de pesquisa “Desenvolvimento e Controle da Qualidade de Fármacos e Medicamentos”, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sob a coordenação da Profa. Dâmaris Silveira.

O extrato bruto foi reconstituído em metanol a 100% até a completa homogeneização. Em seguida foi diluído para uma concentração de trabalho com metanol a 1%. As células foram expostas as concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 300 µg/mL em meio de cultura. Os grupos controle foram células expostas a 30 µL de metanol a 1% por poço e as células não expostas. Os grupos foram cultivados em duplicata para o experimento de viabilidade e triplicata para o qPCR.

4.2. Cultura de células

Células da linhagem de osteossarcoma humano (Saos2, ATCC HTB-85) foram cultivadas como cultura em monocamada em frascos T-75 (Corning, Union City, CA) contendo meio Dulbecco Eagle Modificado (DEMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI/mL), e estreptomicina (100 µg/mL), até confluência.

As células foram cultivadas a 37 °C, umidade de 95%, CO₂ a 5% (todos suplementos de cultura, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). As células aderidas, quando em fase de crescimento logarítmico, foram destacadas com tripsina / EDTA (0,25%) a 37 °C durante 2 minutos e logo após coletadas e semeadas em placas de 12 poços (Corning, Union City, CA) a uma densidade de 4 x10⁴ por poço, pela contagem na câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram incubadas nas mesmas condições descritas acima, durante 24 horas, para se obter adesão das células aos poços da placa de cultura previamente da exposição ao extrato de *Morus nigra* e dos testes de viabilidade celular e qPCR.

4.3. Teste de viabilidade

Para o experimento no teste de viabilidade celular as Saos-2 foram expostas durante um e cinco dias a concentrações do extrato de *Morus nigra* de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 300 µg/mL, além dos grupos controle e metanol 1%.

Após o tempo de exposição, o meio de cultura foi coletado e as células aderidas foram destacadas com o uso de solução tripsina / EDTA (0,25%) e depositadas no Eppendorf. As contagens foram realizadas segundo o método de exclusão de células coradas pelo azul de Tripán (Sigma). Os procedimentos de contagem seguiram a seguinte ordem de procedimento;

- coleta das células em Eppendorf;
- centrifugação e aspiração do sobrenadante;
- ressuspensão do precipitado de células em 60 µL de PBS;
- Colocação de 20 µL da solução de azul de Tripán (corante para as células mortas);
- colocação de 20 µL da solução de células em cada parte da câmara de Neubauer e realizado a contagem no microscópio invertido de fase, sendo anotados o número de células vivas e o número de células mortas (coradas em azul) (figura 3). As contagens foram realizadas por três pessoas distintas e de forma duplo-cego. Essa amostra coletada foi avaliada duas vezes independentes por cada examinador (n=12/grupo).

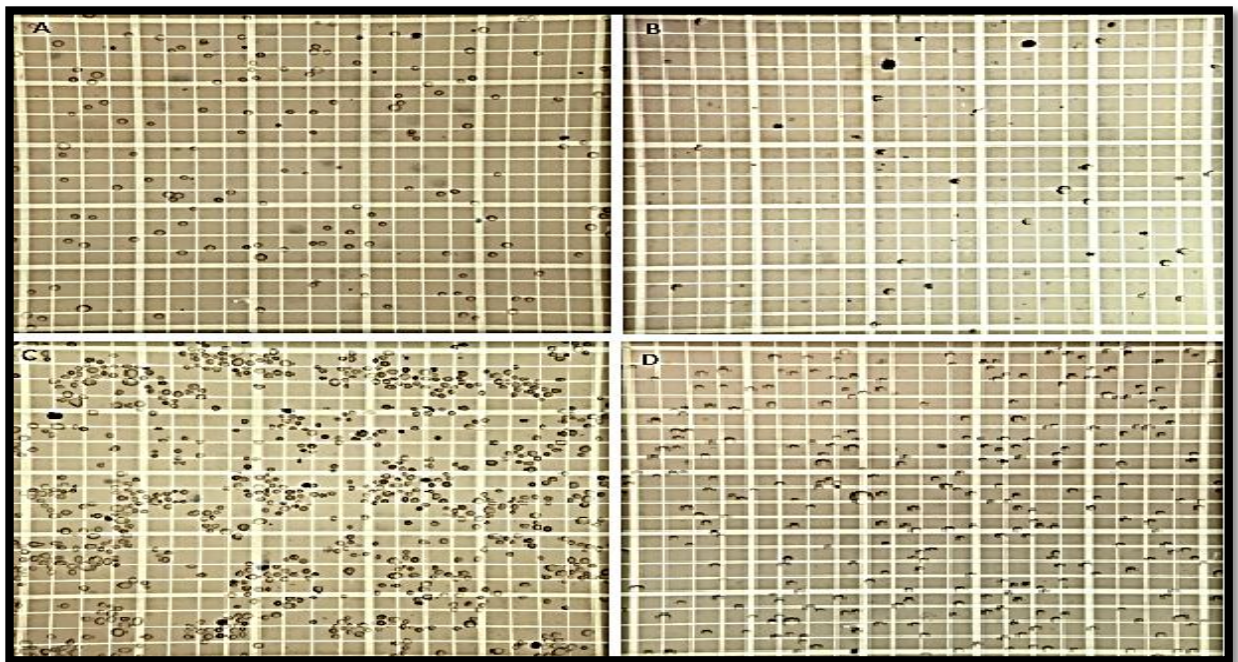


Figura 3. células na câmara de Neubauer com o corante azul de tripan nos grupos tratados com extrato da folha de amora a A é 25 µg/mL e B é 50 µg/mL, C é o grupo controle e D é o grupo com metanol 1% em cultura de 5 dias.

4.4. Extração de RNA total

Todo o procedimento foi realizado em locais cuja bancada era previamente esterilizada com álcool 70% e tratada com a solução para eliminação de RNase RNase Zap (AMBION). Após o procedimento de limpeza, as células foram coletadas em Trizol para extração do RNA total e posterior síntese de cDNA para verificação da expressão dos genes de interesse. O isolamento do RNA total seguiu o protocolo do Trizol Plus:

- Isolamento do RNA;
- Homogeneização da amostra em 400µL de Trizol Plus;
- Adicionou-se 60 µL de clorofórmio (VETEC) e homogeneizou-se a amostra vigorosamente;
- Após 2 minutos de incubação em temperatura ambiente, centrifugou-se a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C;

- A fase aquosa (superior) foi cuidadosamente coletada com pipeta automática, pois continha o RNA total. Houve o cuidado de evitar contaminação com a fase orgânica do centrifugado;
- Precipitação do RNA;
- Logo a seguir, foram adicionados 150 μ L de isopropanol (VETEC) e as amostras de RNA incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos;
- Centrifugou-se novamente por 12.000 xg por 10 minutos a 4°C;
- Limpeza do pellet de RNA;
- Todo o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 400 μ L de etanol 75% (VETEC) ao pellet formado;
- Centrifugou-se por 7.500 xg por 5 minutos a 4°C;
- O sobrenadante foi descartado e os Eppendorf com RNA foram deixados em fluxo laminar para evaporação completa do etanol;
- O RNA total foi ressuspenso em água destilada ultra pura, livre de RNase, DNase e pirogênio (Invitrogen), para posterior mensuração da concentração e qualidade do RNA. No equipamento NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). O RNA utilizado para a síntese de cDNA deveria ter valor de absorbância A260/A280 entre 1,8 e 2,0, indicando a qualidade da amostra.

4.5. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen) em tubos de 0,2 mL. Todos os passos indicados pelo fabricante foram seguidos. O protocolo consistia em duas fases: inicialmente calculou-se o volume necessário da amostra de RNA previamente isolada para alcançar o valor de 2 μ g de RNA total para cada 40 μ L de reação de síntese de cDNA. Em seguida, adicionou-se ao tubo *gDNA wipeout buffer*, que contém enzima para eliminação de contaminação

por DNA genômico. Logo após, incubou-se o tubo em termociclador por 2 minutos a 42°C.

A segunda fase consiste, seguindo as proporções propostas pelo fabricante, em adicionar:

1. *Quanti Reverse Transcriptase* que contém enzimas com alta afinidade para o RNA e melhora a síntese de cDNA, além de inibidores de RNases;
2. *Quantiscript RT buffer* que contém Mg^{2+} e dNTP's;
3. *RT primer mix* que é uma mistura de oligoDT e *primers* randômicos.

Logo em seguida, a reação foi realizada a 30 minutos a 42°C e 2 minutos a 95°C. O último ciclo inibe a *Quanti Reverse transcriptase*. Após a finalização de todas as etapas o tubo contendo cDNA foi imediatamente colocado no gelo e, em seguida, estocado em freezer -20°C até o momento da avaliação de expressão gênica por PCR *real time*.

4.6. PCR *real time* (qPCR)

Os primers utilizados já haviam sido validados no laboratório de biotecnologia da UnB.

Tabela 1. Desenhos dos primers e cada transcrito da espécie *Homo sapiens*.

Gene	Sequência dos primers
BCL2	F: TGTGGATGACTGAGTACCTG R: GCCAGGAGAAATCAAACAGAG
BAX	F: GGGCTGGACATTGGACTTC R: ACAAAGATGGTCACGGTCTG
GADPH	F: GGAAGGTGAAGGTCCGAG R: AGTTGAGGTCAATGAAGGG

1

Para o PCR *real time* trabalhou-se com um cDNA *mix* e um *primer mix* de componentes para diminuir o erro de pipetagem. No cDNA *mix* eram colocados o cDNA (25-50 µg/µL de cDNA por poço de reação), água destilada ultra pura livre de

RNase, DNase e pirogênio e o SybrGreen Fast (Applied Biosystem). Já o *primer mix* correspondia a mistura do *primers Forward* e *Reverse* diluídos em água, sendo que a concentração final de *primer* para o PCR *real time* era de 100 nM de *Forward* e 100 nM de *Reverse* por poço.

As reações de PCR foram preparadas em Eppendorf 0,2 de mL com volume final de reação de 30 µL. As reações de PCR foram feitas utilizando triplicatas idênticas.

Os ciclos de PCR foram 95°C por 20 segundos, para ativação da enzima; 95°C por 3 segundos, para desnaturação; e 60°C por 30 segundos para anelamento e extensão do cDNA (Sybr Green Fast; Applied Biosystem). O PCR *real time* foi feito em sistema *ROTOR GENE* (BIORAD) e o acúmulo dos produtos da amplificação do DNA de interesse foi mensurado pelo aumento da fluorescência de *SybrGreen Fast* (*ROTOR GENE*) a cada ciclo. Os dados foram analisados no Software do *Step One Plus* (Applied Biosystem). Para cálculo da quantificação relativa de expressão gênica de cada gene foi utilizado o método $\Delta\Delta CT$ com o Fold de 2. Todos os valores de expressão foram padronizados pelo gene controle gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

4.7. Análise estatística

Todos os dados obtidos nas reações de qPCR foram submetidos a análise estatística, utilizando o programa StatPlus:mac. *One way* ANOVA, Bonferroni (*post hoc*), as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$ ($n = 3/\text{grupo}$).

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidade celular

Para o experimento no teste de viabilidade celular optamos por utilizar as concentrações do extrato de *Morus nigra* de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 300 µg/mL, além dos grupos controle de células não expostas e metanol 1% conforme

visto em literatura. *In vitro*, mostrou-se que a solução do extrato da folha de amora, teve efeito de morte celular sobre a célula tumoral, nas concentrações de 300 µg/mL e na concentração de 100 µg/mL (viabilidade celular de 70%) em cultura de 24 horas (figura 4).

Já na cultura de 5 dias houve viabilidade de 0% nas concentrações expostas ao extrato de *Morus nigra* 100 µg/mL e 300 µg/mL, e na concentração de 50 µg/mL houve uma viabilidade de aproximadamente 60%, enquanto que nos demais grupos houve viabilidade de 100% (figura 4).

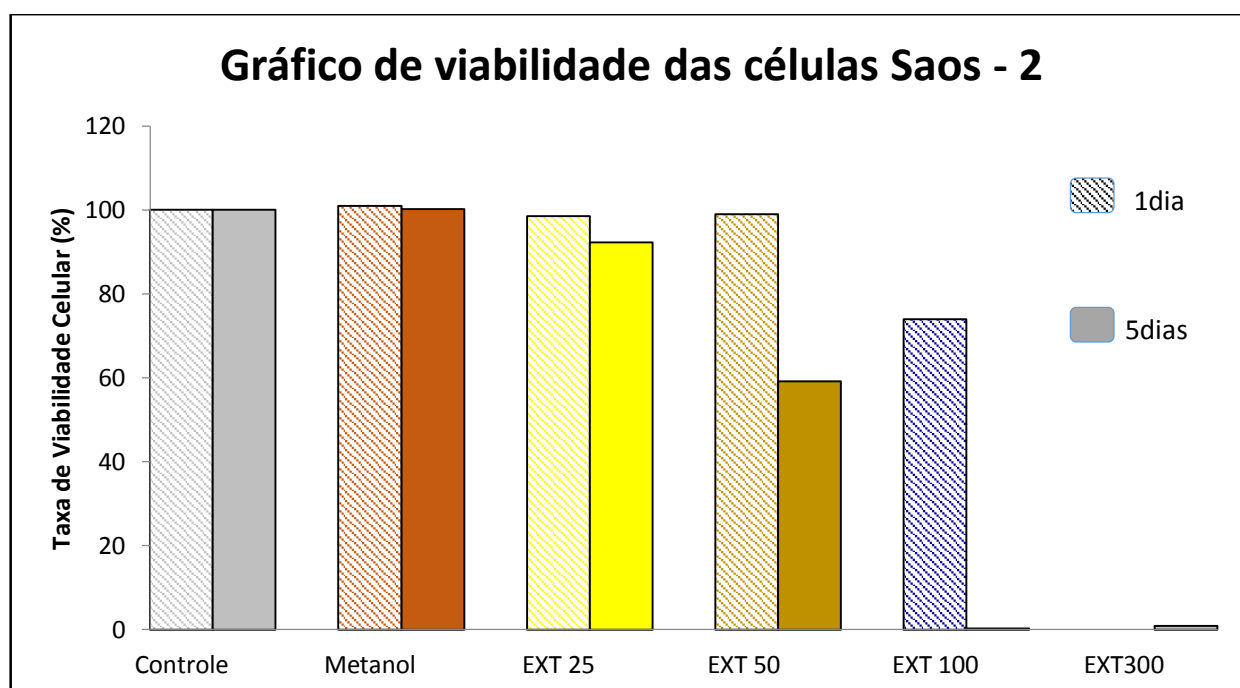


Figura 4. Gráfico de viabilidade celular de Saos-2. Metanol, células expostas a metanol 1%; EXT 25, extrato de M nigra 25 µg/mL; EXT 50, extrato de M nigra 50 µg/mL; EXT 100; extrato de M nigra 100 µg/mL; EXT 300, extrato de M nigra 300 µg/mL; grupo controle, células não expostas. (n= 3/grupo)

5.2. Expressão de BCL2 e BAX

Obteve-se um aumento nos resultados do PCR *real time* na expressão de mRNA de BAX (figura 5) das células expostas ao extrato de *M. nigra* nas concentração de 25 µg/mL, apresentando diferença estatística em relação aos outros grupos

(Anova, Bonferroni post-test, $p < 0.05$), enquanto que na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ e no grupo exposto a 30 μL de metanol a 1% foram similares ao controle

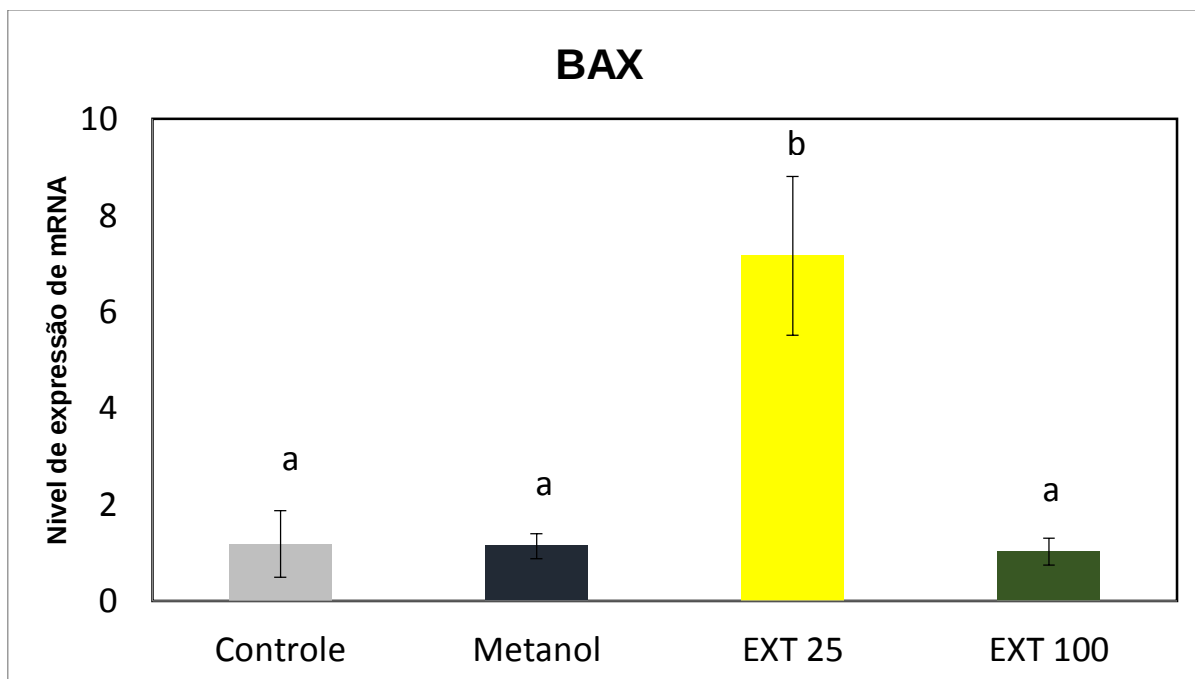


Figura 5. Níveis de expressão de mRNA de BAX em Saos-2 expostas a extrato de *Morus nigra*. Exposição das células Saos – 2 ao extrato nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ (EXT 25) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (EXT 100), grupo controle de células não expostas e grupo com 30 μL de metanol a 1%. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Anova, Bonferroni post-test, $p < 0.05$)

Nos resultados do qPCR na expressão de BCL2 (figura 6) das células expostas ao extrato de *M. nigra* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ houve diferença estatística em relação aos outros grupos (Anova, Bonferroni post-test, $p < 0.05$). o grupo de 25 $\mu\text{g/mL}$ e o grupo exposto a 30 μL de metanol a 1% foram semelhantes ao controle.

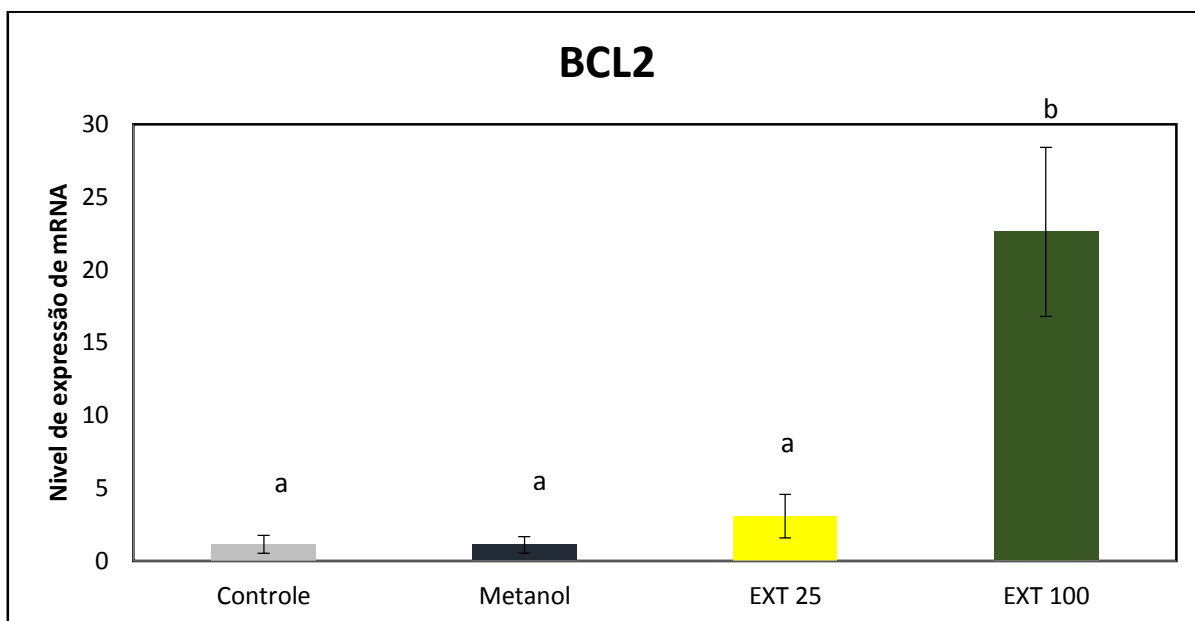


Figura 6. Níveis de expressão de mRNA de BCL2 em Saos-2 expostas a extrato de *Morus nigra*.

Exposição das células Saos – 2 ao extrato nas concentrações de 25 µg/mL (EXT 25) e 100 µg/mL (EXT 100), grupo controle de células não expostas e grupo com 30 µL de metanol a 1%. Letras diferentes representam estatísticas significativas (Anova, Bonferroni post-test, $p < 0.05$) ($n = 3/\text{grupo}$)

6. DISCUSSÃO

Os estudos de toxicidade in vitro têm demonstrado que testes com culturas celulares são métodos rápidos, sensíveis e reprodutíveis

O teste do azul Tripan avalia o grau de comprometimento estrutural da membrana plasmática. Em razão de o corante ser macromolecular, não há possibilidade de ser absorvido pelos poros da membrana plasmática de células viáveis. Contudo, quando a membrana plasmática sofre alterações estruturais e se torna permeável ao corante, as células são coradas em azul (DIB et al., 2009).

No Brasil, o uso de plantas é amplamente utilizado para cura de doenças em diversas populações, sendo necessário validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. As pertencentes ao gênero *Morus* têm um potencial uso como fitoterápicos. Sendo importante a realização de estudos toxicológicos (TALLINI et al., 2015).

Contém inúmeros constituintes os extratos das plantas, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à

presença de compostos de classes ou estruturas diferentes. Estudos como o de LUCAS et al., 2013 já demonstraram a ação antiproliferativa do flavonoide em células do sistema imune.

Os resultados do teste de viabilidade demonstraram que a solução do extrato da folha de *M. nigra*, provocou morte celular em Saos-2 de forma dose e tempo dependente.

A viabilidade de 0% nas concentrações expostas ao extrato de *Morus nigra* 100 µg/mL e 300 µg/mL, e na concentração de 50 µg/mL houve uma viabilidade de aproximadamente 60%, na cultura de 5 dias. Sugerindo que a morte celular pelo extrato de amora é tempo e concentração dependente, sob o microscópio de observação as células apresentavam um volume menor com morfologia distorcida.

Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose (figura 7), mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças ambientais (ANAZETTI e MELO, 2007).

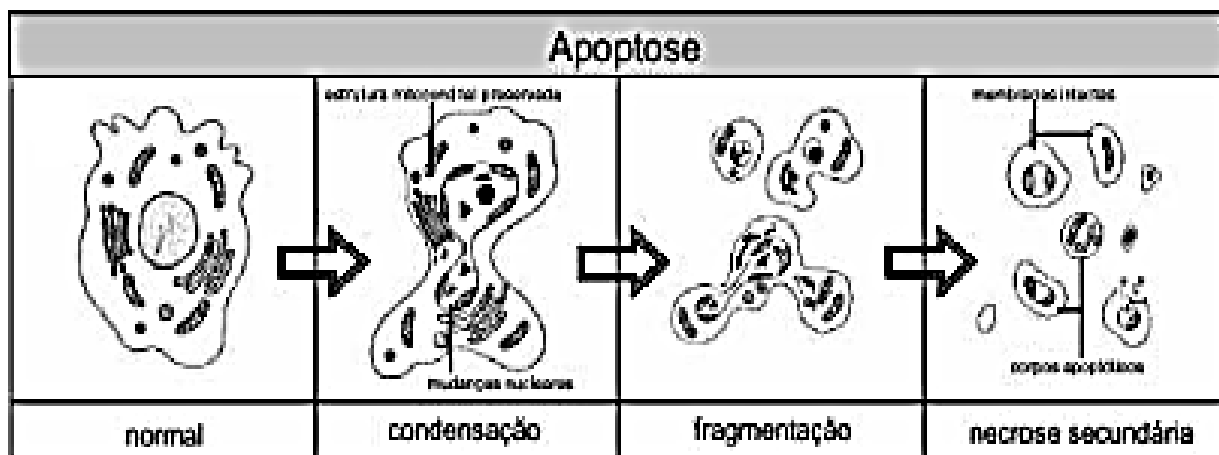


Figura 7 O processo apoptótico envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.

No PCR em tempo real obtivemos um aumento na expressão de mRNA de BAX das células expostas ao extrato de *M. nigra* na concentração de 25 µg/mL, sugerindo uma via alternativa para a regulação desse gene, pois as células de osteossarcoma apresentam mutação na P53. Isso foi mostrado em um estudo feito por ELISEEV et al. em 2008, no qual sugere-se que BAX possui um novo regulador transcricional

(ELISEEV *et al.*, 2008). Já na concentração de 100 µg/mL do extrato não apresentou alterações significativas, talvez por o extrato já mostrar efeitos tóxicos nessa concentração em 24 horas.

No estudo de LIU *et al.* de 2013 associou-se à morte de células de osteossarcoma humano a quantidade de flavonoides presentes no extrato da *Caulis spatholobi*, extraído com diferentes solventes. O extrato de acetato de etila apresentou a maior quantidade de flavonoides e a maior taxa de mortalidade celular (LIU *et al.*, 2013).

Na expressão de mRNA de BCL2 das células expostas ao extrato de *M. nigra* nas concentração de 100 µg/mL, houve um aumento. Sendo BCL2 uma proteína antipoteótica percebe-se uma tentativa de sobrevivência das células expostas a essa concentração causando um feed back.

Sugere-se que o extrato de *Morus nigra* esteja iniciando processo de apoptose via citocromo C, um co-fator na ativação de caspases. Nesse sentido, a Terapia com o extrato de *Morus* possui potencial para superar a resistência das células neoplásicas à apoptose.

7. CONCLUSÃO

Ficou demonstrado que o extrato de *M. nigra* é capaz de ativar as vias de apoptose em Saos – 2, causando a morte celular de forma dose e tempo dependentes, tornando um potencial tratamento para tumores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAMWIT, P., BANG, N., SRICHANA, T. **The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits.** Food Research International 43, 2010.

ARAMWIT, P., BANG, N., SRICHANA, T. **The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits.** Food Research International 43, 2010.

BAEA, S. -H., SUH, H. -J. **Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea.** Swiss Society of Food Science and Technology. Published by Elsevier Ltd. 2006

BHUJUNA, V. S. N., MUNOGEEB, N., COOLEN, V. **Antioxidant and anti-inflammatory efficacies of polyherbal formulations and elixirs traditionally used in Mauritius for the treatment of rheumatoid Arthritis.** jornal of herbal medicine, 2014.

BIELACK, S. S. *et al.* **Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols.** Journal of Clinical Oncology, v. 20, n. 3, p. 776-790, 2002.

CHEN, P.-N., CHU S.-C., CHIOU, H.-L., KUO, W. -H., CHIANG, C. -L. **Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line -S.** Cancer Letters 235, 2006.

DIB, E. *et al.* **Vital dyes in chromovitrectomy.** Arquivos brasileiros de oftalmologia, v. 72, n. 6, p. 845-850, 2009.

DU, Lin *et al.* **Establishment and characterization of a new highly metastatic human osteosarcoma cell line derived from Saos2.** International journal of clinical and experimental pathology, v. 7, n. 6, p. 2871, 2014.

ELISEEV, R. A. *et al.* **Runx2-mediated activation of the Bax gene increases osteosarcoma cell sensitivity to apoptosis.** Oncogene, v. 27, n. 25, p. 3605-3614, 2008.

ERCISLI, S., ORHAN, E. **Chemical composition of white (Morus alba), red (Morus rubra) and black (Morus nigra) mulberry fruits.** Food Chemistry 103 (2007) 1380–1384.

ERCISLI, S., ORHAN, E. **Some physico-chemical characteristics of black mulberry (Morus nigra L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey.** Scientia Horticulturae 116 (2008) 41–46.

- Gálvez M, Martín-Cordero C, López-Lázaro M, Cortés F, Ayuso MJ. **Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines.** J Ethnopharmacol. 2003; 88(2):125-30.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** cell, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** cell, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011
- HARA, M. R.; CASCIO, M. B.; SAWA, A. **GAPDH as a sensor of NO stress.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, v. 1762, n. 5, p. 502-509, 2006.
- Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. **The sulforhodamine B assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity.** Methods. 2007; 42(4):377-87.
- JAFFE, N.; GORLICK, R. **High-dose methotrexate in osteosarcoma: let the questions surcease—time for final acceptance.**Journal of Clinical Oncology, v. 26, n. 27, p. 4365-4366, 2008.
- JEMAL, A. *et al.* **Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends.** Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, v. 19, n. 8, p. 1893-1907, 2010.
- LAURICELLA, M. *et al.* **Induction of apoptosis in human osteosarcoma Saos-2 cells by the proteasome inhibitor MG132 and the protective effect of pRb.**Cell Death & Differentiation, v. 10, n. 8, p. 930-932, 2003.
- LIU, B. *et al.* **Study on anticancer activity of caulis *spatholobi* extract on human osteosarcoma saos-2 cells.** African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, v. 10, n. 5, p. 256-260, 2013.
- LUCAS, C. D. *et al.* **Flavones induce neutrophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1 via a proteasomal-dependent pathway.** The FASEB Journal, v. 27, n. 3, p. 1084-1094, 2013.

MACIEL, M. A. M. *et al.* **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química nova, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MEÇA, K. K. O. *et al.* **Apoptose e expressão de Bcl-2 e das caspases 3 e 8 em placenta bovina, em diferentes estádios de gestação.** Arq. bras. med. vet. zootec, v. 62, n. 2, p. 258-264, 2010.

Ministério da Saúde. **Sistema de informações sobre mortalidade (SIM).** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obtmmap.htm>>. Acesso em: 20 de novembro de 2015.

MOGHADDAM, G. *et al.* **Antiproliferative activity of flavonoids: influence of the sequential methoxylation state of the flavonoid structure.** Phytotherapy Research, v. 26, n. 7, p. 1023-1028, 2012.

Oliveira CC, Cabrini DA, Santos EP, Marques MCA, Buchi DF. **Canova medication and medicinal plants in south of Brazil.** In: Pretorius R, editor. Trends and Developments in thnopharmacology. Kerala: Research Signpost; 2008. p. 111-29.

OLIVEIRA, A.C.B.; OLIVEIRA, A.P.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, R.A.; SILVA, F.S.; REIS, S.A.G.B.; RIBEIRO, L.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S. **Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae).** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.15, n.2, p.244-249, 2013.

OZGEN, M. SERC, S. KAYA, C. **Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits.** Scientia Horticulturae 119. 2009. 275–279.

PADILHA, M. M., MOREIRA, L. Q., MORAIS, F. F., ARAÚJO, T. H., SILVA, G. A. **Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Junho de 2010.

PADILHA, M.M.; VILELA, F.C.; SILVA, M.J.D.; SANTOS, M.H.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. **Antinociceptive effect of *Morus nigra* leaves in mice.** Journal of Medicinal Food, p.1381-1385, 2009.

PAWLOWSKA, A. M., OLESZEK, W., BRACA, A. **Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of Morus nigra L. and Morus alba L. (Moraceae) Fruits.** J. Agric. Food Chem. 2008.

PICCI, P. **Osteosarcoma (osteogenic sarcoma).** Orphanet journal of rare diseases, v. 2, n. 1, p. 1, 2007.

TA, H. T. et al. **Osteosarcoma treatment: state of the art.** Cancer and Metastasis Reviews, v. 28, n. 1-2, p. 247-263, 2009.

TALLINI, L. R. *et al.* **Analysis of flavonoids in Rubus erythrocladus and Morus nigra leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 25, n. 3, p. 219-227, 2015.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. **Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions.** Nature reviews cancer, v. 8, n. 10, p. 755-768, 2008.

VOLPATO, G.T., CALDERON, I.M.P., SINZATO, S., CAMPOS, K.E., RUDGE, M.V.C., DAMASCENO, D.C. **Effect of Morus nigra aqueous extract treatment on the maternal–fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats.** Journal of Ethnopharmacology 138 (2011).

ZHENG, Z.-P.; CHENG, K.-W.; ZHU, Q.; WANG, X.-C.; LIN, Z.-X.; WANG, M. **Tyrosinase Inhibitory Constituents from the Roots of Morus nigra: A Structure-Activity Relationship Study.** J. Agric. Food Chem., Vol. 58, No. 9, 2010.

ZHONG, H.; SIMONS, J. W. Direct comparison of GAPDH, β -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. Biochemical and biophysical research communications, v. 259, n. 3, p. 523-526, 1999.

Sociedade Brasileira de Cancerologia (SBC): Departamento de cancerologia da Associação medica brasileira. Acesso em: 15 de junho de 2016.
http://www.sbcancer.org.br/home2/site/index.php?option=com_content&view=article&id=117:cancer-osseo&catid=29&Itemid=123

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. **Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular.** Metrocamp pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.