

Beatriz D. O. Miranda da Cruz (*)
Marilda Meirelles de Oliveira (*)
Joyce Biondi (*)
Ana Esmeralda Roxo (*)
Clélia Helena O. Martinez (**)

RESUMO

A descoberta de novas drogas (produtos naturais e substâncias sintéticas) com atividade antineoplástica vem sendo dificultada devido ao teste de laboratório "in vivo". Optou-se, então por usar para triagem dessas drogas antitumorais a cultura de célula humana neoplástica cultivada de modo contínuo: a linhagem de célula HeLa derivada por Gey de um carcinoma uterino humano. Foi utilizada uma cultura de célula estacionária, diluída 0-20 mcg/ml (conteúdo proteico celular, segundo técnica de Oyama e Eagle) em meio basal de Eagle com 10% de soro de vitelo, acrescido de penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100 mcg/ml e fungizon 5 mcg/ml. A essa cultura adicionou-se o material a ser testado em doses compreendidas entre 0,001 mcg/ml a 100 mcg/ml. Após 72 horas, os resultados foram analisados para determinar-se a DI 50 (dose que inibe 50% do crescimento celular comparado ao controle). O número de experimentos foram constantes para uma mesma droga. Foram testadas 18 substâncias sintéticas e 16 produtos naturais. Consideraram-se ativas as amostras com DI $50 \leq 40$ mcg/ml para produtos naturais e com DI $50 \leq 8$ mcg/ml para substâncias sintéticas devido a menor sensibilidade da referida linhagem celular em relação a KB (derivada de carcinoma epidermóide de nasofaringe humana) cultura utilizada pelo National Cancer Institute (U.S.A.) para objetivos similares ao proposto no presente trabalho.

INTRODUÇÃO

O "National Cancer Institute" (NCI) vem desde os anos 60 utilizando testes "in vitro" para a seleção de agentes antitumorais provenientes de plantas. A linhagem de célula usada para esse fim é a KB de Eagle (Eagle, 1955).

(*) Instituto Biológico, São Paulo - SP.

(**) Instituto Adolfo Lutz, São Paulo - SP.

De todos os agentes antitumorais de extratos brutos de plantas agora em desenvolvimento ou em avaliação clínica (taxol, elipticina, maytansina, talicarpina) somente N-óxido indicina teria sido descoberto utilizando-se unicamente o screening "in vivo" (Perdue, 1982), os outros teriam sido detectados através de "screening" em KB.

Numerosas são as vantagens de se utilizar um teste "in vitro" como um pré-"screening" destes agentes antitumorais, como o custo inferior, a exigência de menor quantidade de material e menos dispêndio de tempo.

No Brasil, temos vários grupos trabalhando na área de produtos naturais, que eventualmente, teriam a necessidade de empregar um teste para se verificar as atividades quimioterapêuticas e mais especificamente antitumorais, dessas substâncias.

Este teste "in vitro", usando cultura de célula KB, é mais sensível à maioria dos agentes tumorais de extratos de plantas que muitos testes "in vivo". E o NCI até 1981 já havia testado, dessa forma 114.045 extratos vegetais (Suffness & Douros, 1982).

Não havendo disponibilidade desta linhagem celular, desenvolvemos o teste com a linhagem de célula Hela (Gey et al., 1952), derivada de carcinoma uterino humano. Resultados similares quanto a positividade mas variando a ordem de grandeza quando comparados aos da linhagem KB, já foram observados por (Bramrilia et al., 1970).

MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem de célula Hela, foi nos fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz.

Baseando nos trabalhos de "screening" desenvolvidos pelo NCI com a linhagem celular KB (Geran et al., 1972) e nas suas atualizações (Instruction 14, 1980), utilizamos a mesma metodologia introduzindo como modificação o emprego da linhagem celular Hela.

A cultura de células estacionárias é cultivada em meio basal de Eagle e adicionada de 10% de soro de vitelo, contendo penicilina 100 μ /ml, estreptomicina 100 mcg/ml concentração sugerida por (Bird & Forrester, 1981) e amphotericin B (fungizon) 5mcg/ml (concentração dentro do limite aceitável segundo Fogh, 1973).

Na determinação do experimento levou-se em conta que:

- 1) Cada material a ser testado deveria apresentar de 3 a 5 níveis de doses diferentes;
- 2) Cada dose deveria ser utilizada em duplicata;
- 3) Cada material a ser testado, deveria possuir o seu respectivo controle.

Os materiais para teste, tanto os produtos naturais como os sintéticos deveriam apresentar uma solução clara ou uma suspensão homogênea. Estes materiais foram escolhidos ao acaso, baseados somente na suspeita de atividade antineoplástica. Alguns deles foram inclusive estudados em nosso laboratório como inibidores de crescimento de outros tipos de tumores experimentais "in vivo", como leucemia L 1210 e carcinoma de Ehrlich.

Os veículos usados para diluição do material teste foram os aprovados pelo NCI. A quantidade do material teste e o veículo foi uniforme no experimento não excedendo em até 5% do volume total. O volume total é de 4 ml. As doses testadas situaram-se, em

geral, entre 0,001 e 100 mcg/ml de cada droga.

Para iniciar o experimento, a uma suspensão de células de 0-20 mcg/ml contendo protótipo celular determinado segundo a técnica de (Oyama & Eagle, 1956), adicionou-se o material a ser testado na concentração desejada. Concomitantemente foram feitos os controles e os padrões.

Após 72 horas, foi feita uma análise protéica (Oyama & Eagle, 1956) dos tubos testes, controles e de 3 padrões. Todos comparados à curva padrão de albumina bovina.

Os produtos em análise foram testados no mínimo 3 vezes.

Os resultados são expressos com a dose que inibiu o crescimento em 50% (DI 50) comparado ao controle, através da seguinte fórmula:

$$\% I = \frac{\text{Proteína final controle} - \text{Proteína final tratado}}{\text{Proteína final controle} - \text{Proteína inicial controle}} \times 100$$

(porcentagem de inibição)

A DI 50 é calculada graficamente numa curva de porcentagem de inibição (% I) na abcissa versus o logaritmo da dose, na ordenada em papel semi-log.

Foram considerados ativos os produtos naturais que tiveram uma DI 50 \leq 60 mcg/ml no primeiro teste e uma DI \leq 40 mcg/ml no segundo e na confirmação. Para substâncias sintéticas, no primeiro teste considerou-se ativas aquelas que apresentaram DI 50 \leq 12 mcg/ml e no segundo e na confirmação uma DI 50 \leq 8 mcg/ml.

RESULTADOS

Foram testadas 18 substâncias sintéticas, sendo que 4 mostraram-se ativas: 3-2-dihidroxi-3-carboxi-2 (gama dimetil-alil)-1 indanona, cloridrato de olivacina, 1,4-naftoquinona, 2 metoxi-1,4 naftoquinona.

Na tabela 1, estão apresentados estes resultados.

Foram testados 16 extratos de produtos naturais, sendo que 2 mostraram atividade: *Serjania caracasana* e *Croton cajucara* Benth. A tabela 2 resume estes resultados.

DISCUSSÃO

Numerosas drogas apresentam uma seletiva toxicidade letal a células tumorais quando comparadas a células normais. Muitas delas foram descobertas pelo método de "screening" e este fato tem contribuído para que se convença da utilidade deste método na descoberta de novas drogas (Schabel, 1972).

Observa-se ainda que a descoberta de produtos como a vinblastina, vincristina e podofilotoxina e todos os 9 agentes antitumorais originários de plantas, agora em desen-

volvimento ou em avaliação clínica é atribuída a testes "in vitro" utilizando-se extratos ativos em KB, pois segundo Perdue (1982), somente o N-óxido indicina teria sido descoberto por teste "in vivo".

Usando uma equivalência a este teste, como um pré-"screening" de testes animais, porém com a linhagem de célula Hela, conseguimos resultados bastante satisfatórios.

Ampliamos a DI 50, ou melhor duplicamo-la, pois (Bramilla *et al.*, 1970), mostraram uma diferença de sensibilidade das duas linhagens, sem no entanto deixarem de comparar entre si. Esta menor sensibilidade das células Hela, também foi observada por (Tew *et al.*, 1983) onde o estradiol não se mostra tóxico, por estas células não apresentarem receptores aos mesmos, enquanto que o estramustine (derivado esteróide N-mustard) é citotóxico para Hela.

Alguns dos materiais testados já haviam sido experimentados "in vivo" em nosso laboratório, em outros tipos de tumores implantados em animais.

Dentre 18 substâncias sintéticas, temos 9 casos que são: 7 verdadeiros negativos (inativo "in vitro" e inativo "in vivo"), 1 verdadeiro positivo (ativo "in vitro" e ativo "in vivo") e 1 falso positivo (ativo "in vitro" e inativo "in vivo").

O alcalóide olivacina, que foi ativo tanto "in vitro" como "in vivo" em leucemia linfóide L 1210 (25 mg/kg) (Sampaio & Oliveira, 1974), foi usado na forma de derivado pois parece haver uma melhora em sua atuação, possivelmente por modificar sua solubilidade.

Também foi observado atividade da olivacina (de 5 a 450 mcg/ml) noutro teste "in vitro" utilizando o método Di Paolo modificado (Sampaio *et al.*, 1984).

A 3,2-dihidroxi-3-carboxi-2-(gama dimetil-alil)-1-indanona, foi ativa "in vitro" entretanto mostrou-se inativa contra o carcinosarcoma de Walker 256 (150 mg/kg) (em resultados não publicados de nosso laboratório).

Dentre as triazinas, somente a 2,4-diamino-1,2-dihidro-1-(3-metil-fenil)-6,6-dimetil-triazina cloridrato não foi testada em carcinosarcoma de Walker 256 em nosso laboratório, obtendo-se com as outras os mesmos resultados que "in vitro" ou seja, todas foram inativas. (Tounsend *et al.*, 1982) mostra que a permeabilidade da membrana parece ser o parâmetro determinante no transporte de triazinatos após a injeção.

Das drogas; o sal de hexamínium do ácido 3-bromo-metil-4-propoxi-benzoico, o sal de hexamínium do ácido 3-bromo-metil-4-amiloxi-benzoico e o ácido-3-(Br-meteno) p-toluico foram também testados em nosso laboratório em carcinoma de Ehrlich, demonstrando inativos nas doses 60mg/kg, 60 mg/kg e 20 mg/kg respectivamente.

Algumas naftoquinonas, apresentaram atividade quando testadas em leucemia P 388 (Oliveira *et al.*, 1978). Em nosso trabalho duas amostras desta classe de substâncias entre as três testadas, também apresentaram atividade.

Dentre os produtos naturais estudados, 11 podem ser comparados com testes "in vivo" sendo 10 verdadeiros falsos (inativo "in vitro", inativo "in vivo") e 1 verdadeiro positivo (ativo "in vitro" e ativo "in vivo").

A *Serjania caracasana*, o verdadeiro positivo, apresentou atividade em carcinoma de Ehrlich (30 mg/kg) e também no método Di Paolo modificado até 50 µg/ml (Sampaio *et al.*,

1984) em concordância com os nossos resultados.

As **Vellozias piresiana** e **caput** (400 mg/kg) e a **sipunculóidea** (100 mg/kg) foram tóxicas para camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich. As **Vellozias** supracitadas (500 mcg/ml) foram ativas no método Di Paolo modificado (Sampaio *et al.*, 1984), sendo inativas em nossos resultados. Merecem entretanto, maiores pesquisas, uma vez que se sabe que essas plantas contêm lignanas e entre elas alguns anticancerígenos como podofilotoxina.

O **Maytenus ilicifolium** foi inativo em nosso trabalho e em sarcoma 180 (resultados não publicados), quando injetado em camundongos portadores desta neoplasia, na dose de 400 mg/kg.

A **Leucaena glauca**, **Chlorophora tinctoria**, café verde (400 mg/kg) e **Swartzia acuminata** (100 mg/kg) foram testadas em carcinoma de Walker 256, sendo inativas tal qual em nossos resultados.

Há, hoje grande preocupação em usar sistemas "in vitro" para auxiliar no tratamento do câncer humano (Tweit *et al.*, 1982; Poste, 1982; Sutherland *et al.*, 1983). Há portanto a necessidade de se acelerar os processos básicos para encontrar estes quimioterápicos, ou seja um "pré-screening" para se determinar que substâncias deveriam ser encaminhadas para o teste "in vivo" e continuar estas pesquisas e desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos.

Sugerimos aqui o "pré-screening" com célula HeLa que nos pareceu útil, pois seus resultados correspondem ao da célula KB.

O "KB-screening" continua sendo utilizado no NCI para a determinação da atividade de extratos de plantas, o mesmo pretendemos fazer em futuro próximo, para trabalhos comparativos.

Gostaríamos de observar que o efeito de se usar pré-"screening" de produtos fermentados com atividade antineoplástica, no NCI, para descobrir novas drogas anti-câncer reduziu o número de testes "in vivo" em 83% e, além desse aspecto, se observou um custo inferior de elaboração, permitindo uma identificação mais rápida de substâncias ativas (Suffness & Douros, 1982), que é o objetivo de todos que trabalham neste campo de pesquisas.

A utilização do pré-"screening" demonstra-se particularmente útil, se associarmos os 2 métodos "in vitro" e "in vivo", pois ganha-se tempo com maior probabilidade de sucesso. Num extrato de produto natural sugere-se iniciar com um pré-"screening" "in vitro", sendo depois encaminhado para testes "in vivo", que iria sugerir o fracionamento deste, com ajuda de testes "in vitro" que periodicamente seriam confirmadas suas atividades "in vivo".

SUMMARY

Screening has been and continues to be the most useful and productive method of detecting antitumor agents. "In vitro" assay is less expensive and require ... less test.

material and time. The antitumor assay for screening plants extracts since 1960, by NCI (National Cancer Institute) has been slightly modified. It has been used HeLa cell culture (cell line derived from human carcinoma of uterus) instead of the original KB (cell line derived from human carcinoma of nasopharynx). HeLa cells were cultivated on Eagle's basal medium plus 10% serum added of antibiotics: penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 mcg/ml and amphotericin 5 mcg/ml. To a dilute stock cells of 10^6 - 20^6 mcg/ml (protein values according to method of Oyama and Eagle) in complete media was simultaneously added test material (range concentration 1-100 mcg/ml) Test material were either synthetics or natural products.

Total volume was approximately 4 ml. Also a blank and control was done. After 72 hours was conducted a protein analysis of tests, control and at least three protein standard and media blank tubes. Results were expressed as the dose that inhibits growth to 50% of control growth (ED 50). The criteria of activity for synthetics was an ED $50 \leq 12$ mcg/ml on the first test and an ED $50 \leq 4$ mcg/ml on the second and confirmation tests; and for natural products were an ED $50 \leq 60$ mcg/ml on the first test and an ED $50 \leq 40$ mcg/ml on the second and confirmation tests.

Tabela 1. Atividade de produtos sintéticos na linhagem de célula HeLa.

SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS	ED ₅₀		SOLUBILIDADE	ATIVIDADE
	(mcg/ml)			
3,2-dihidroxi-3-carboxi-2-(gama dimetil-alil)-1-indanona	00,05		Salina	ATIVA
2,4-diamino-1,2-dihidro-1-(2-metil-5-nitro-fenil)-6,6-dimetil-triazina cloridrato	----		Salina	Inativa
2,4-diamino-1,2-dihidro-1-(3-metil-fenil)-6,6-dimetil-triazina cloridrato	----		Salina	Inativa
5-(3-clorofenil)-2,4-diamino-6,6-dimetil-triazina-monocloridrato	----		Salina	Inativa
2,4-diamino-1,6-dihidro-1-(2-metil-5-clorofenil)-6,6-dimetil triazina cloridrato	----		Salina	Inativa
2,4-diamino-1,2-dihidroxi-1-(3,4-diclorofenil)-6,6-dimetil-triazina (HCl)	----		DMSO + Salina	Inativa
sal de hexaminium do ácido 3-bromo-metil-4-propoxi-benzóico	----		DMSO + Salina	Inativa
sal de hexaminium do ácido 3-bromo-metil-4-amiloxi-benzóico	12,10		DMSO + Salina	Inativa
sal de hexaminium do ácido 3-clorometil-4-butoxi-benzóico	10,40		Salina	Inativa
ácido-3-(Br-metano)p-toluico	23,50		DMSO + Salina	Inativa
cloridrato de olivacina	05,40		HCl + Salina	ATIVA
2-hidroxi-3-(2',5'-diclorofenil-aminometil)-1,4-naftoquinona	29,00		DMSO	Inativa
1,4-naftoquinona	03,70		DMSO	ATIVA
2 metoxi-1,4-naftoquinona	00,27		DMSO	ATIVA
2-hidroxi-3-(2-metil propenil)-1,4-naftoquinona	----		DMSO	Inativa
1-amino-2-hidroxi-4-sulfonico naftaleno	----		DMSO	Inativa
vermelho neutro	16,80		Salina	Inativa
maitenina	----		DMSO	Inativa

Tabela 2. Atividade de produtos naturais na linhagem de célula HeLa.

EXTRATO	SOLUBILIDADE	ED ₅₀ (mcg/ml)	ATIVIDADE
<i>Serjania caracasana</i> (ext. butanol da casca e do caule)	alcoól + salina	18,0	ATIVA
<i>Croton cajucara</i> Benth. (ext. bruto da folha)	DMSO	12,0	ATIVA
Casca de cacau (ext. aquoso)	Salina	----	Inativa
<i>Crassostrea</i> (ext. aquoso)	Salina + carboxi-metil- celulose 0,5%	----	Inativa
<i>Maytenus ilicifolium</i> (ext. aquoso de caule)	Salina	----	Inativa
<i>Grazieillantus purpurea</i> (raiz e caule ext. bruto etanólico)	DMSO	----	Inativa
<i>Wedelia scaberrima</i> (folha ext. bruto etanólico)	DMSO	----	Inativa
<i>Vellozia piresiana</i> (ext. bruto da folha em hexano)	DMSO	----	Inativa
<i>Leucaena glauca</i> Benth. (ext. etanólico das folhas)	DMSO	----	Inativa
<i>Swartzia acuminata</i> (semente, ext. etanólico)	DMSO	----	Inativa
Café verde comercial liofilizado (ext. aquoso)	Salina	----	Inativa
<i>Vellozia caput, Ardal</i> (parte caule e raiz, ext. bruto etanólico)	Etanol absoluto	----	Inativa
<i>Chlorophora tinctoria</i> (ext. etanólico madeira)	DMSO	----	Inativa
<i>Inga edulis</i> (semente, ext. etanólico)	DMSO	----	Inativa
<i>Copaifera trapezipholia</i> (semente, ext. bruto etanólico)	DMSO	----	Inativa
<i>Sipunculoidea</i> (ext. aquoso)	DMSO	----	Inativa

Referências bibliográficas

- Bird, B. R. & Forrester, F. T. - 1981. "Basic Laboratory Techniques in cell culture" U.S. Department of Health and Humans Services
- Brambilla, G.; Baldini, L.; Galli, G. - 1970. "Osservazioni sull'attività di diversi chemioterapici antineoplastici sullo sviluppo di culture di cellule Hela e KB"-**Boll. Soc. Ital. Biol.**, Sper 42(22):1679-82.
- Eagle, H. - 1955. Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 89: 362-364.
- Fogh, J. - 1973. Contamination in Tissue Culture - **Academic Press**, New York & London.
- Geran, R. I.; Greenberg, N.H.; Macdonald, M.M.; Schumacher, A. M.; Abbot, B.J. - 1972. Protocols for Screening Chemical Agents and natural Products Against Tumors and other Biological Systems, 3rd Edition National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA.
- Gay, G.O.; Coffman, W.D.; Kubicek, M.T. - 1952. Tissue culture Studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Research**, 12:264.
- Instruction 14 - 1980. Screening data Summary Interpretation and Outline of Cuneit Screen. Drug Evaluation Branch Drug Research and Development Program Division of Cancer Treatment, NCI. Bethesda Md, U.S.A.
- Oliveira, M. M. de; Linardi, M. C. F.; Sampaio, M. R. D. - 1978. Effects of quinone derivatives on an experimental tumor. **J. Pharm. Sci.**, 67: 562-3.
- Oyama, V. L. & Eagle, H. - 1956. Measurement of cell Growth in Tissue Culture with a phenol Reagent (Folin-Ciocalteu). **Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.**, 91: 305-307.
- Perdue, R. E. Jr. - 1982. KB cell culture I. Role in Discovery of antitumor agents from Higher Plants", **Journal of Natural Products**, 45(4).
- Poste, G. - 1982. Experimental systems for analysis of the malignant phenotype. **Cancer Metastasis Rev** 1(2): 141-199.
- Sampaio, M. R. P.; Nakamura I. T.; Oliveira Jr., B. S.; Oliveira M. M. de - 1984. Modificações do método de Di Paolo e Moore, para testes de substâncias anticancerígenas. **Arquivos do Instituto Biológico**. (No prelo).
- Sampaio, M. R. P. & Oliveira, M. M. de - 1974. Algumas experiências com a Olivacina em leucemia linfóide L 1210 de camundongo. **São Paulo. Ciênc. Cult.**, 26:517-520.
- Schabel Jr., F. - 1972. Screening, the Cornerstone of Chemotherapy. **Cancer Chemotherapy Reports Part 2**, vol 3, nº 1.
- Stiffness, M. & Douros, J. - 1982. Current Status of the NCI plant and animal product program. **Journal of Natural Products**, 45(1).
- Sutherland, C. M.; Mather, P. J.; Carter, R. D.; Cerise, E. J.; Krementz, E. T. - 1983. Breast cancer as analysed by the human tumor stem cell assay". **Surgery**, 94(2):370-5.
- Tew, K. O.; Erickson, L. C.; White, G.; Wang, A. L.; Schein, P. S.; Hartley Asp B. - 1983 Cytotoxicity of estramustine, a steroid nitrogen mustard derivative, through non-DNA targets. **Mol. Pharmacol** 24(2) : 324-8.
- Townsend, J. G.; Jain, R. K.; Cahmore, A. R. - 1982. "In vivo" pharmacokinetics of triazinate in L-1210 e W-256 cells. **J. Pharmsci.**, 71(10):1102-5.
- Tweit, K. M.; Fodstad, O.; Lotsberg, J.; Vaage, S.; Phil, A. - 1982. Colony growth and chemosensitivity in vitro of human melanoma biopsies. Relationship to clinical parameters. **Inst. J. Cancer**, 29(5): 533-8.