

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA SUSPENSÃO DE BETA-
GLUCANOS EM EXTRATO AQUOSO DE *CAMELIA SINENSIS* EM
LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIAPROMIELOCÍTICA AGUDA**

EVALUATION OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF BETA-GLUCAN IN
AQUEOUS EXTRACT OF *CAMELIA SINENSIS* SUSPENSION IN ACUTE
LEUKEMIA PROMIELOCYTIC CELL LINE

Naara Bueno Pinheiro¹, Manoela Marques Ortega²

¹Estudante do Curso de Biomedicina, Universidade São Francisco, Bragança Paulista,
São Paulo, Brasil.

²Docente do Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde,
Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A leucemia promielocítica aguda (LPA) representa 10-15% das leucemias mielóides agudas, caracterizada pela translocação t(15q17);(22q21) presente em 90% dos pacientes com a doença e resultando na síntese de uma oncoproteína quimérica *PML/RAR α* , responsável pela inibição da diferenciação celular da linhagem mielocítica. Beta-glucanos (β -GLU) são polissacarídeos naturais constituídos de monômeros D-glicose com uma ligação beta-glicosídica encontrados nas paredes celulares de fungos, bactérias, algas, plantas e leveduras, capazes de melhorar o sistema imunológico e têm sido utilizados para o tratamento de síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV), níveis altos de colesterol, diabetes e, recentemente, neoplasias. Há poucos estudos sobre o efeito de β -GLU em linhagens celulares de leucemia. Este trabalho apresenta uma avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo do BiovitBioglucan® (SEMS farmacêutica, Lindóia, São Paulo) constituído de β -GLU(β -1,3-1,6 DGlucano), na linhagem celular de LPA, HL60. O efeito citotóxico foi avaliado pelo método do MTT. A proliferação celular foi avaliada por contagem utilizando azul de trypan por 4 dias de tratamento com diferentes concentrações de BiovitBioglucan®. Foi observado o efeito citotóxico do BiovitBioglucan® pelo MTT, sendo o IC50 390,62 μ g/mL por 72h. O ensaio de proliferação celular evidenciou o efeito antiproliferativo do BiovitBioglucan® ($P < 0,05$) na linhagem celular HL60.

Palavras-chave: Leucemia promielocítica aguda, efeito citotóxico e anti-proliferativo, BiovitBioglucan®.

ABSTRACT

Acute promyelocytic leukemia (APL) represents 10-15% of myeloid acute leukemia, characterized by translocation t(15q17);(22q21) present in 90% of patients with the disease that result in a synthesis of a chimeric oncoprotein PML/RAR α , responsible by the inhibition of myeloid cell differentiation. Beta-glucan (B-GLU) are natural polysaccharides formed by monomers of D-glucose with a beta-glycosidic bond found in cell wall of fungi, bacteria, algae, plants and yeasts, capable to improve immune system and had been used to treat acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), high levels of blood cholesterol, diabetes and, recently, neoplasms. There are few studies about the effect of B-GLU on leukemia cell lines. This work presents an evaluation of the anti proliferative and cytotoxic effect of BiovitBioglucan® (SEMS pharmaceutical, Lindóia, São Paulo) consisting by B-GLU (B-1,3-1,6 D Glucan), in APL cell line, HL60. The cytotoxic effect was evaluated by MTT assay. The cell proliferation was evaluated by counting using trypan blue for 4 days with different concentrations of BiovitBioglucan. We observed the cytotoxic effect of BiovitBioglucan by MTT and found the IC₅₀ 390.62 ug/mL for 72 hours. The proliferation assay showed the anti proliferative effect of BiovitBioglucan® (p<0.05) in H60 cells.

Key words: Acute promyelocytic leukemia, cytotoxic and anti proliferative, BiovitBioglucan®.

INTRODUÇÃO

As leucemias são classificadas de acordo com a proliferação neoplásica das linhagens celulares mielóides e linfóides^{1, 2}. Ainda, as leucemias são subdivididas em aguda, a qual os mieloblastos ou linfoblastos apresentam proliferação celular acentuada, mas perdem a capacidade de maturação e diferenciação e, em crônica, caracterizada por se originar dos precursores celulares mielocíticos ou linfocíticos da medula óssea, gerando clones neoplásicos diferenciados e maduros, porém disfuncionais, resultando em um acúmulo de um único clone de células maduras na medula óssea e no sangue periférico^{1, 2}.

Segundo o Grupo de Estudos Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB), as leucemias podem ser subdivididas, de acordo com os aspectos morfológicos e citotímicos, em leucemias linfocíticas crônicas (LLC), leucemias linfocíticas agudas (LLA), leucemias mielóides crônicas (LMC) e leucemias mielóides agudas (LMA)². As LMAs são doenças malignas clonais de células progenitoras mielóides ou mieloblastos que perderam a capacidade de maturação e diferenciação, resultando no acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, dificultando a produção normal das outras células sanguíneas³. As principais causas desse tipo de leucemia podem ser radiações ionizantes gama ou beta, agentes químicos tóxicos e farmacológicos, como benzeno e agentes alquilantes, infecções virais como o vírus T-linfotrópico humano (HTLV), que infecta as células de defesa do organismo, os linfócitos T e tabagismo³. Também, fatores genéticos, caracterizados por alterações cromossômicas, tais como a síndrome de *Down*, síndrome de *Bloom*, e síndrome de *Fanconi*³. As LMAs originam-se na medula óssea e com a evolução da doença as células neoplásicas extravasam para o sangue periférico, podendo chegar a outros órgãos como fígado, baço, linfonodos e outros tecidos³.

As LMAs acarretam adultos jovens, com idade entre 18-63 anos³. As principais manifestações clínicas da doença são palidez, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, infecções constantes, petéquias e outras manifestações hemorrágicas, dores em articulações e ossos e a hipertrofia gengival devido ao acúmulo de células neoplásicas³. O hemograma ao diagnóstico apresenta trombocitopenia, hematócrito em baixos níveis, hemácias com característica normocítica e normocrômica, neutropenia e leucopenia³.

As LMAs são classificadas em subtipos M0 a M7, de acordo com a morfologia celular e a imunofenotipagem⁴. A leucemia promielocítica aguda (LPA) é classificada como subtipo M3 e é caracterizada pela diferenciação anormal de células mielocíticas⁵.

A LPA afeta predominantemente adultos jovens de ambos os sexos com 40 anos de idade⁵. Cerca de 90% dos pacientes com LPA apresentam a translocação cromossômica t(15;17)q(22;21), o que resulta na fusão dos genes receptor alfa do ácido retinóico(*RARα*) e leucemia promielocítica aguda (*PML*), sintetizando uma oncoproteína quimérica *PML/RARα*, com alteração do ácido retinóico bloqueando a diferenciação da linhagem mieloide⁵. A morfologia celular dos promielócitos é caracterizada por núcleos excêntricos com granulações citoplasmáticas e bastões de *Auer* no citoplasma⁵.

O tratamento comumente adotado para pacientes com LPA com a translocação (15;17)q(22;21) é o ácido transretinoico(ATRA), responsável por induzir a diferenciação, maturação e apoptose das células leucêmicas⁶. Cerca de 99% dos pacientes obtêm a remissão e a sobrevida livre da doença por até 5 anos após o tratamento⁶. Entretanto, 5-20% dos pacientes desenvolvem síndrome do ácido retinoico ou síndrome de diferenciação, que consiste de lesão pulmonar, sintomas respiratórios, febre, dores ósseas, edema, falência cardíaca, insuficiência renal, derrames cavitários, além de outros efeitos colaterais, podendo dificultar o tratamento ou ser fatal ao indivíduo⁶, o que justifica a procura de novos tratamentos⁶.

Beta-glucanos são polissacarídeos naturais, constituídos de monômeros de D-glicose com uma ligação beta-glicosídica, encontrada nas paredes celulares de fungos, bactérias, algas, plantas e leveduras⁸. Recentemente, os beta-glucanos foram utilizados como tratamento complementar de diabetes, colesterol, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e neoplasias⁹.

Estudos *in vitro* sugeriram que Beta-glucanos podem aumentar a maturação das células dendríticas derivadas de monócitos, facilitando o reconhecimento dos receptores na superfície celular, como o receptor de complemento CR3 e consequentemente levarem a atividade citotóxica e morte das células leucêmicas⁷. Além disso, beta-glucanos ajudaram a induzir a diferenciação de células dendríticas a partir de linhagens de células leucêmicas monocíticas⁷. As células dendríticas derivadas de leucemia são imunopotentes e podem desencadear respostas de células T anti-leucêmicas, as quais irão ativar linfócitos B (CD19+/ CD20+) produzirem anticorpos anti-leucêmicos¹⁰. O BiovitBioglucan® é uma suspensão de beta-glucanos β-GLU(β-1,3-1,6 DGlucano) e extrato aquoso de *Cameliasinensis*. Não há estudos sobre os efeitos citotóxicos e antiproliferativos do BiovitBioglucan® na linhagem celular de LPA, HL60.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem Celular

A linhagem celular de LPA, HL60, foi gentilmente doada pela Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas. A linhagem foi mantida em meio de cultura RPMI(Cultilab,Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab, Brasil)em estufa a 37°C, 5% de CO₂.

BiovitBioglucan®

O BiovitBioglucan® foi gentilmente doado pelo Dr. Samuel Silva, Diretor executivo da SEMS Biofarmacêutica, Pesquisa e Desenvolvimento, Lindóia, SP. É uma suspensão de β -glucanos obtidas a partir *Saccharomyces cerevisiae* constituído de β -1,3-1,6 (DGlucanos) (5%), extrato aquoso de flavonóides originados da *Camelia sinensis*(0,3%) e menos de 2% de estabilizantes ácido sórbico e benzoato de sódio. Foram utilizadas concentrações seriadas a partir da concentração inicial máxima (50.0000 $\mu\text{g/mL}$; 25.000 $\mu\text{g/mL}$; 12.500 $\mu\text{g/mL}$; 6.250 $\mu\text{g/mL}$; 3.125 $\mu\text{g/mL}$; 1.525 $\mu\text{g/mL}$; 781,25 $\mu\text{g/mL}$; 390,62 $\mu\text{g/mL}$; 195,30 $\mu\text{g/mL}$; 97,65 $\mu\text{g/mL}$), sendo que as diferentes diluições foram realizadas com meio de cultura RPMI 10% SFB no momento do tratamento.

Ensaio MTT

O ensaio pelo método [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio] ou MTT foi utilizado para avaliar o efeito citotóxico¹¹ do BiovitBioglucan® por 24, 48 e 72 horas de tratamento com as concentrações acima indicadas. Resumidamente, foram plaqueadas cerca de $0,2 \times 10^6$ células HL60 em placas de cultivo celular de 96 poços, em triplicata para cada concentração e tempos indicados. Após, foi adicionado 2 $\mu\text{g/mL}$ de MTT (Sigma, Estados Unidos) em cada poço e incubação por 4 horas a 37°C. Cerca de 100 μL de dimetil sulfóxido (DMSO)(Synth, Brasil) foram adicionados em cada poço e após 15 minutos de incubação, foi realizado a leitura de absorbância à 540nm em leitor de microplacas (Thermo Fisher, Estados Unidos). Uma triplicata de células não tratadas com o BiovitBioglucan® foi utilizada como controle.

Ensaio da proliferação celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado para verificar o potencial antiproliferativo do BiovitBioglucan®. Cerca de $0,2 \times 10^6$ células HL60 por poço foram cultivadas em placas de cultivo celular de 24 poços com meio RPMI 10% SFB e BiovitBioglucan® na concentração de 390,62 µg/mL por 72 horas de tratamento em triplicata. Uma triplicata de células não tratadas com o BiovitBioglucan® foi utilizada como controle. Após 24 horas de tratamento as células foram contadas utilizando azul de Trypan(Sigma, Estados Unidos)e câmara de *Newbauer*, e foram replaqueadas em seguida. O mesmo foi realizado após 48, 72 e 96 horas de tratamento.

Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. A diferença entre os múltiplos grupos foi analisada por análise de variância unidirecional seguida pelo teste de Tukey e ANOVA. Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o *software* SPSS. 11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). $P < 0,05$ foi considerado para indicar uma diferença estatisticamente significativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio MTT

O ensaio MTT possibilitou a avaliação do efeito citotóxico do BiovitBioglucan® na linhagem celular HL60. Foi possível observar efeito citotóxico acentuado após 24 e 48 horas de tratamento, nas concentrações de 50.0000 e 25.000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1). Entretanto, após 72 horas de tratamento, foi possível observar efeito citotóxico abaixo do IC50 (quando 50% das células estão viáveis) (Figura 1). A concentração de 390,6 $\mu\text{g/mL}$ por 72 horas foi escolhida como a melhor concentração e tempo para o tratamento com o BiovitBioglucan®.

Em nosso melhor conhecimento, não há estudos anteriores mostrando o efeito citotóxico do BiovitBioglucan® em linhagem celular de LPA, HL60.

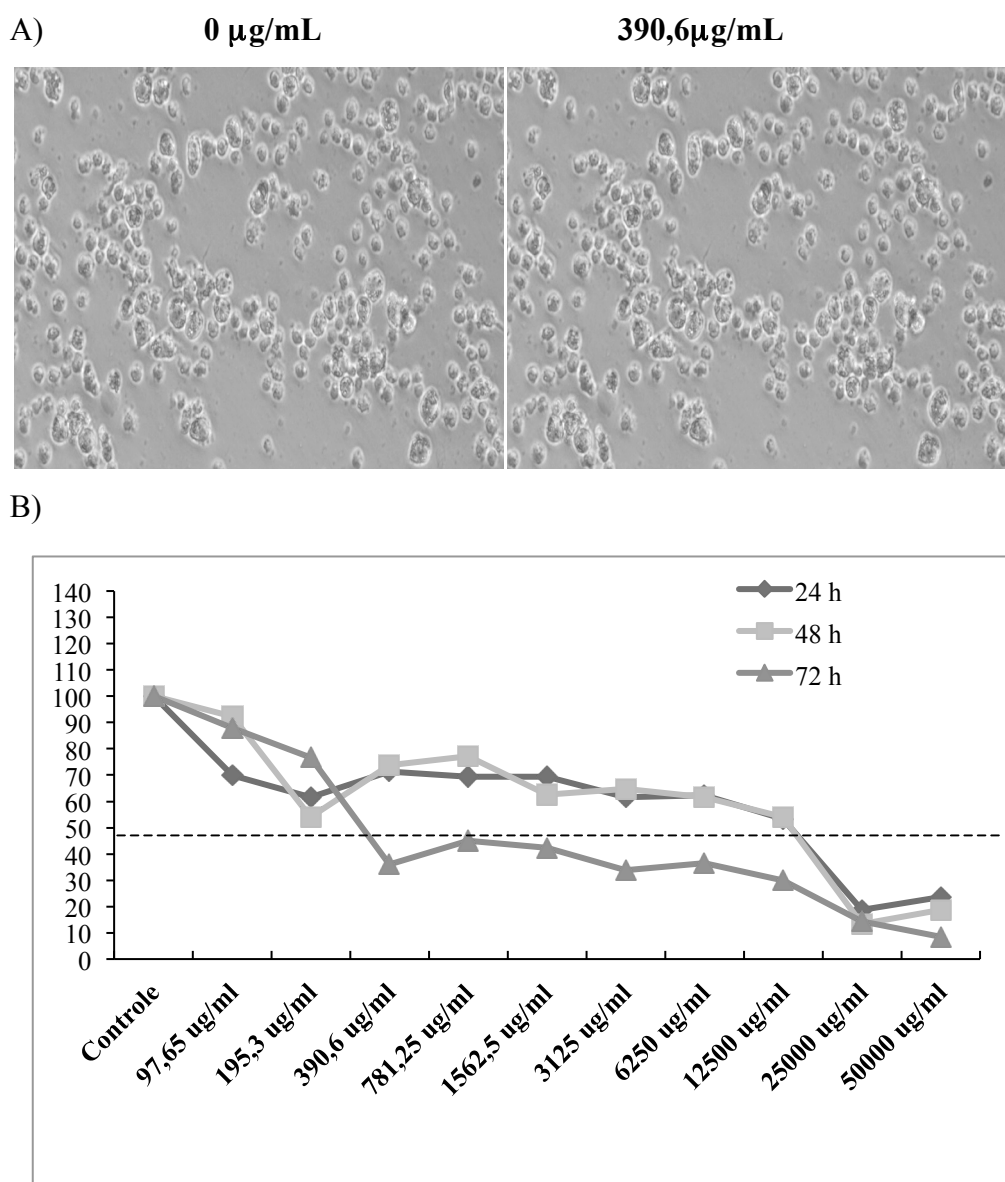


Figura1: A) Morfologia celular da linhagem HL60 antes e após tratamento com BiovitBioglucan. B) Curva de citotoxicidade do BiovitBioglucan® pelo método MTT em linhagem celular de leucemia promielocítica aguda (HL60). As células foram cultivadas com diferentes concentrações de BiovitBioglucan® por 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação celular possibilitou avaliação do efeito antiproliferativo do BiovitBioglucan® na linhagem celular HL60. A concentração adotada para avaliar a proliferação foi $390,6 \mu\text{g/mL}$ por 72 horas de tratamento (IC_{50}). Foi possível observar o efeito antiproliferativo a partir de 48 horas de tratamento, apresentando efeito acentuado com 72 horas (Figura 2). Diminuição acentuada do número de células foi verificado

($P < 0,05$) nas células tratadas BiovitBioglucan® em comparação com as células controles contendo apenas meio de cultura celular. Não há estudos anteriores mostrando o efeito antiproliferativo do BiovitBioglucan® em linhagens celular HL60.

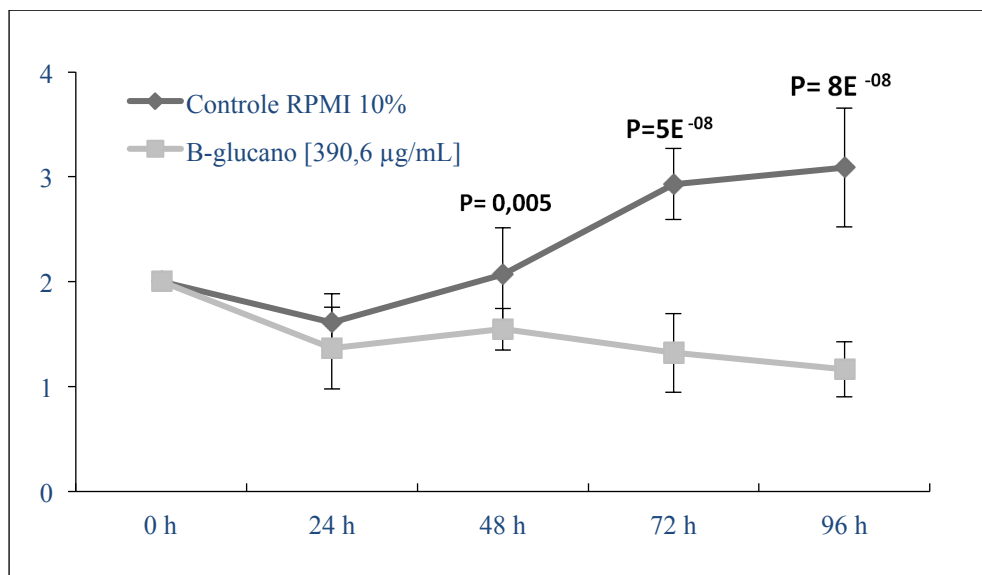


Figura 2. Curva do efeito antiproliferativo do BiovitBioglucan® pela contagem das células da linhagem celular de leucemia promielocítica aguda (HL60) com azul de *Trypan*. As células foram tratadas com BiovitBioglucan® na concentração de 390,6 µg/mL por 72 horas, em triplicata. P valores menores que 0,05 foram considerados significativos.

CONCLUSÃO

O BiovitBioglucan® apresentou efeitos citotóxico e antiproliferativo na linhagem celular HL60. A combinação de β -1,3-1,6 (DGlucanos) e flavonóides originados da *Camelia sinensis*, pode ter colaborado para os efeitos observados na linhagem celular estudada. Entretanto, futuros ensaios serão realizados para confirmar os resultados aqui apresentados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ZAGO, Marco Antônio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. Tratado de hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013.
2. SANTOS, Paulo Caleb Júnior. Hematologia- Métodos e Interpretação. São Paulo: Roca, 2013.
3. SILVA, Grazielle C. et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, vol. 42, n. 2, p. 77-84, 2006.
4. SILVEIRA, Neiva Albertina et al. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. *Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar*, vol. 12, n. 1, p. 5-14, 2012.
5. SAGRILLO, Michele R. et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 27, n. 2, p. 94-101, 2005.
6. JACOMO, Rafael Henriques et al. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. *Revista de Associação Médica Brasileira*, vol. 54, n. 1, p. 82-89, 2008
7. VETVICKA, Vaclav. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World Journal of Clinical Oncology*, vol. 2, n. 2, p. 115-9, 2011.
8. KIM, Yea-Woon et al. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnology letters*, vol. 27, n. 7, p. 483-487, 2005.
9. RAHAR, Sandeep et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, vol. 2, n. 2, p. 94, 2011.
10. CHAN, Godfrey Chi-Fung et al. "The Effects of B-Glucan on Human Immune and Cancer Cells." *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 2, n. 25, 2009.
11. Lim S-W et al. Reduction of MTT to Purple Formazan by Vitamin E Isomers in the Absence of Cells. *Tropical Life Sciences Research*, vol. 26, n. 1, p. 111-120, 2015.
12. YEDJOU, Clement G., Pamela Moore e Paul B. Tchounwou. "Dose e Resposta Dependente do Tempo de Leucemia Humana (HL-60) para Tratamento de Trióxido de Arsênio". *Revista Internacional de Pesquisa Ambiental e Saúde Pública*, vol. 3, n. 2 ,p.136-140,2006.