AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA 3-HIDROXICUMARINA FRENTE À LINHAGEM CELULAR HeLa

E. B. OLIVEIRA¹, J. M. BARBOSA FILHO², R. S. A. ARAUJO², C. G. RODRIGUES³, E. C. SILVA¹, e P. L. MEDEIROS¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia.

² Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biofísica e Radiobiologia.

E-mail para contato: berwelly@gmail.com

RESUMO - Os produtos naturais foram considerados boas ferramentas para a prospecção de novos medicamentos ativos ou modelos para novas drogas terapêuticas. As cumarinas são um grupo de compostos fenólicos naturais que apresentam várias atividades farmacológicas e a 3-hidroxicumarina representa moléculas valiosas alvo contra diversas doenças. O objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade citotóxica *in vitro* da 3-hidroxicumarina em células HeLa e avaliar os aspectos morfológicos da linha celular. A citotoxicidade foi medida usando o ensaio colorimétrico MTT e as características morfológicas dessas células foram avaliadas por microscopia de contraste de fase. Os resultados deste primeiro estudo demonstraram a atividade citotóxica da 3-hidroxicumarina nas linhas celulares HeLa. O teste MTT fornece informações sobre a atividade citotóxica e a proliferação de células HeLa foi significativamente ($p < 0,05$) inibida de 100 µg / mL de 3-hidroxicumarina, revelando alterações morfológicas em altas concentrações (100 a 400 µg / mL). Com base nos resultados, são necessários mais estudos para elucidar o mecanismo de ação de 3-hidroxicumarina de forma abrangente.

Palavras-chave: 3-hidroxicumarina; célula HeLa; Análise morfológica

ABSTRACT – Natural products have been considered good tools for prospecting of new active drugs or models for new therapeutic drugs. Coumarins are a group of natural phenolic compounds that shows several pharmacological activities and the 3-hydroxycoumarin represents as target valuable molecules against several diseases. The aim of present work was to investigate the *in vitro* cytotoxic activity of 3-hydroxycoumarin on HeLa cells and to evaluate the morphological aspects of the cell line. Cytotoxicity was measured using MTT colorimetric assay and the morphological features of these cells were evaluated by phase-contrast microscopy. The results of this first study have demonstrated to cytotoxic activity

of 3-hydroxycoumarin on HeLa cell lines. MTT assay provides information regarding the cytotoxic activity and the proliferation of HeLa cell was significantly ($p < 0.05$) inhibited from 100 $\mu\text{g/mL}$ of 3-hydroxycoumarin, revealing morphological changes in high concentrations (100 to 400 $\mu\text{g/mL}$). Based on the results, more studies are required to elucidate the mechanism 3-hydroxycoumarin action in a comprehensive manner.

Keywords: 3-hydroxycoumarin; HeLa cells; cytotoxic activity; morphological analysis.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com base na medicina popular tem sido um dos principais alvos da indústria farmacêutica que vem tentando encontrar novos protótipos úteis para as drogas direcionadas ao tratamento de diversas doenças. Isso levou a um ressurgimento do interesse nos metabólitos secundários produzidos como compostos fenólicos, entre os quais destacam a cumarina (WHO, 2003). Estas substâncias purificadas exibem atividades biológicas potentes e relevantes, além da sua baixa toxicidade de mamífero (HOULT & PAYA, 1996).

Embora alguns estudos tenham demonstrado várias atividades biológicas de derivados de cumarina natural e sintética, a atividade de certas hidroxycumarinas, como a 3-hidroxycumarina, não foi investigada. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica *in vitro* da 3-hidroxycumarina na célula HeLa e avaliar os aspectos morfológicos dessa linhagem celular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Avaliação de atividade citotóxica *in vitro* da 3-hidroxycumarina frente à célula HeLa.

As células HeLa (carcinoma cervical humano) foram cultivados com meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado e 0,1% de antibióticos. A cultura foi mantida em estufa de CO_2 a 5%, 85% de umidade a 37°C . A citotoxicidade foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). A substância 3-hidroxycumarina foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionada em diferentes concentrações (0,78 a 400 $\mu\text{g/mL}$). Como controle negativo foi usado o DMSO a 0,5%. As placas foram lidas em uma leitora de microplacas em 595 nm. Foram realizados três experimentos em triplicatas.

2.3. Análise morfológica da célula HeLa frente a 3-hidroxycumarina.

Após o tratamento, as características morfológicas das células foram avaliadas no microscópio invertido com contraste de fase equipado com câmera digital. Registros de fotomicrografias foram realizados usando o Motic Images Plus 2.0 software.

2.4. Análise estatística.

Os dados foram analisados usando o programa Origem 8.2. Todos os resultados obtidos neste estudo são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de experimentos realizados em triplicata. Os valores dos grupos foram comparados utilizando a análise de

variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade citotóxica de 3-hidroxicumarina nas células do carcinoma cervical humano (células HeLa) apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) com concentrações a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1).

As cumarinas e seus derivados podem exercer atividade anticancerígena através de vários mecanismos: inibição da enzima telomerase, regulação negativa da expressão do oncogene (NASR et al., 2014) e entre as hidroxicumomarininas, a 7,8-hidroxicumarina pode demonstrar essa ação gerando estresse oxidativo devido à produção de livre espécies radicais em células cancerosas, o que leva a um efeito pró-apoptótico em células U-937 e HL-60 (VAZQUEZ et al., 2012).

Figura 1 – Efeito de diferentes concentrações de 3-hidroxicumarina sobre a viabilidade da célula de carcinoma cervical humano (HeLa). Os dados apresentam médias $\pm$ erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicada. *, representam ($p < 0,05$) significativo versus controle, um teste de análise de variância (ANOVA) seguido por Tukey's.

Os aspectos morfológicos das células HeLa sob efeito de 3-hidroxicumarina em diferentes concentrações (0,78, 50, 100, 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$) foram avaliados com um microscópio de contraste de fase. Os resultados mostraram que células HeLa foram cultivadas como monocamadas aderentes com efeitos de baixa dose de 3-hidroxicumarina (0,78 a 50 $\mu\text{g/mL}$). As alterações morfológicas foram observadas nas concentrações mais altas (100 a 400 $\mu\text{g/mL}$) revelando uma diminuição da densidade celular global, bem como grupos de células com cromatina condensada, segmentação nuclear, encolhimento e detritos celulares (Figura 2).

Figura 2 – Fotomicrografias das células HeLa sob o efeito de diferentes concentrações de 3-hidroxicumarina e o controle (DMSO). Nas menores concentrações (0,78 a 50 $\mu\text{g/mL}$), as células permaneciam em monocamadas aderidas. Mudanças morfológicas foram observadas nas concentrações mais altas (100 a 400 $\mu\text{g/mL}$) revelando uma diminuição da densidade celular, bem como aglomerados de células com cromatina condensada (setas cheias), encolhimento citoplasmático (cabeça de seta), segmentação nuclear (setas curtas) e detritos celulares (setas curvas). Aument:100 X.

4. CONCLUSÃO

O efeito citotóxico da 3-hidroxicumarina nas células HeLa foi relatada pela primeira vez no presente estudo. A toxicidade induzida por 3-hidroxicumarina e alterações morfológicas notáveis foram evidentes a partir de 100 µg / mL. Estudos adicionais para elucidar o mecanismo detalhado desses efeitos devem ser realizados.

5. REFERÊNCIAS

HOUTL, J. R. S.; PAYÁ. M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **Gen. Pharmacol.** v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v. 65, p. 55-63, 1983.

NASR, T.; BONDOCK, S.; YOUNS, M. Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** v. 76, p. 539-548, 2014.

VAZQUEZ, R.; RIVEIRO, M. E.; VERMEULEN, M. et al. Structure-anti-leukemic activity relationship study of *ortho*-dihydroxycoumarins in U-937 cells: Key role of the δ -lactone ring in determining differentiation-inducing potency and selective pro-apoptotic action. **Bioorganic Med. Chem.** v. 20, p. 5537-5549, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023**, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2003.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Professor José Maria Barbosa Filho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/ UFPB, ao Professor Cláudio Gabriel Rodrigues/ UFPE e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).