

**Título:** “Avaliação *in vitro* dos efeitos do extrato de *Annona muricata* (graviola) em modelos celulares de câncer gástrico sob a influência do gene *PIWILI*”

“In vitro evaluation of the effects of *Annona muricata* (graviola) extract in cellular models of gastric cancer under the influence of the *PIWILI* gene”

**Autores:** Sabrina Oliveira Araújo, Ingrid Nayara de Farias Ramos, Jorddy Neves Cruz, Monique Feitoza Silva, Thaíssa Vitória Portal Rodrigues, Eloisa Helena de Aguiar Andrade e André Salim Khayat

**Afiliação:** Universidade Federal do Pará

Instituto de Ciências Biológicas

R. Augusto Corrêa, 01 - Guamá, Belém - PA, 66075-110

**E-mail:** [sabrina.araujo@icb.ufpa.br](mailto:sabrina.araujo@icb.ufpa.br)

**Abstract:** A presente pesquisa objetiva-se avaliar a citotoxicidade do extrato bruto feito a partir da folha de *Annona muricata* (graviola) em linhagens tumorais gástricas. Estima-se cerca de 1.660 novos casos de câncer gástrico a cada 100 mil habitantes na região norte do Brasil (INCA, 2020). Desse modo, observa-se a importância do estudo a respeito de novos bioativos que sejam capazes de complementar na terapia oncológica atual. Nesse estudo, foi realizada, por meio de ensaio de MTT, a análise da citotoxicidade de acordo com a concentração do extrato, para o cálculo do  $CI_{50}$  (concentração inibitória média), intervalo de confiança (CI95%) e  $R^2$  em 5 linhagens celulares distintas. Os extratos, tanto o etanólico como o acetônico, apresentaram citotoxicidade nas células de câncer gástrico, principalmente nas linhagens AGP01 e AGP01 *PIWILI*<sup>-/-</sup> sem diferença estatisticamente significativa.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Annona muricata*, câncer gástrico, citotoxicidade.

## Introdução

O câncer é uma doença multifatorial e heterogênea, que é caracterizada pela desordem do ciclo celular, ocorrendo deficiência nas taxas de morte celular com desvio dos mecanismos de controle que surgem devido a mutações genéticas (FELISBERTO Y. dos S *et al.*, 2021). Assim, classificado como um dos principais problemas de saúde pública mundial de acordo com a OMS, ocupando a segunda posição das causas de morte mais comuns.

Dentre os tipos de câncer, o câncer gástrico se mostra preocupante devido a sua alta taxa de mortalidade, sendo o quinto mais incidente no mundo (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, a situação ainda é mais alarmante já que essa neoplasia é a quinta mais presente entre os brasileiros. Estima-se que o Pará, onde se realiza o presente estudo, possui 4,05% dos casos de câncer gástrico do Brasil, sendo o terceiro mais incidente, acometendo tanto homens quanto mulheres (INCA, 2020).

Dessa maneira, a busca por novas formas de terapia mais eficazes e com menos efeitos colaterais se faz necessária. Nesse cenário, produtos naturais originários de plantas mostram-se como principais alternativas para amenizar essa situação, uma vez que têm sido usados para fins medicinais em séculos por inúmeras civilizações (DADDIOUAISSA; AMID, 2018), como a *Annona muricata*, que é pertencente a uma família de produtos naturais já estabelecida, e possui uma significativa bioatividade já analisada, podendo induzir a morte celular de várias células tumorais (YAJID *et al.*, 2018). Essa bioatividade já foi analisada em

diversos estudos que mostram sua eficácia em diferentes tipos de câncer, como mama (NAIK; SELLAPPAN, 2021), colon (Djabir Daddiouaissa *et al.*, 2021), pâncreas (M.P. *et al.*, 2011) e câncer de próstata (Yang *et al.*, 2015), porém poucos são os estudos analisando sua atividade em células neoplásicas gástricas.

Posto isso, o estudo acerca da bioatividade da espécie *Annona muricata* em linhagens de câncer gástrico faz-se necessário, devido a alta incidência desta neoplasia, na região Norte, onde realiza-se o presente estudo. De tal maneira, a pesquisa busca avaliar o uso de *Annona muricata* como mais uma alternativa terapêutica de origem natural.

## **Materiais e Métodos**

### **Linhagem Celular e Cultivo**

As células foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo celular, em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibióticos (estreptomicina e penicilina) e foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. A confluência foi constantemente acompanhada com auxílio de microscópio invertido, e o meio foi trocado sempre que os nutrientes foram consumidos, para dar continuidade à manutenção das células. Para os experimentos, o meio foi desprezado, as células foram lavadas com PBS 1x e posteriormente submetidas à lavagem com tripsina para desprendê-las do fundo das garrafas.

### **Ensaio de Citotoxicidade por MTT**

As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^3$  células/poço (100µL/poço) e mantidas na estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C pelo período de 24 horas para aderência. O extrato de *A. muricata* foi diluído separadamente em DMSO para solução de uso a 10 mg/mL. A partir desta solução foi feita uma diluição em DMEM para obter uma concentração de 100 µg/mL, a partir da qual foi realizadas diluições seriadas para a obtenção de uma curva concentração-resposta (100 µg/mL-1,5625 µg/mL) na placa de 96 poços (100µL/poço), além do controle negativo não tratado. Todas as concentrações foram testadas em quadruplicata para cada linhagem. Após um período de incubação de 72 horas, o sobrenadante das células foi descartado. Posteriormente, foi adicionado 100µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em PBS) e a placa foi incubada novamente na estufa a 5% de CO<sub>2</sub> por mais 3 horas. O ensaio para a obtenção da curva de resposta foi baseado na Concentração Inibitória Média (CI50) da substância, buscando-se avaliar a resposta citotóxica. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placa SpectraMax i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) a um comprimento de onda de 570nm. A análise dos dados foi realizada através do percentual de inibição x log da concentração, determinando suas CI50 e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

## **Resultados**

### **Ensaio de Citotoxicidade por MTT**

Os dois extratos brutos, Extrato Etanólico (EEAM) e Extrato Acetônico de *Annona muricata* (EAAM), foram cedidos por colaboradores do museu Emílio Goeldi, chefiados pela Dra. Eloísa Andrade, feitos a partir das folhas da espécie *Annona muricata*. Inicialmente, o

primeiro experimento realizado foi o ensaio de MTT. Assim, foi realizado o screening inicial com quatro linhagens celulares de câncer gástrico, AGP01, AGP01 *PIWIL1*<sup>-/-</sup>, ACP02, ACP03 e a MRC5, que é uma linhagem de tecido pulmonar humano não neoplásica utilizada como controle. Dessa forma, foi calculado nesse experimento os valores da concentração inibitória média, do R<sup>2</sup> e do intervalo de confiança (Tab. 01 e 02).

**Tabela 1:** Valores da concentração da CI<sub>50</sub> (concentração inibitória média do crescimento celular em µg), com a realização do teste do MTT, após 72h de incubação tratadas com EEAM, para quatro linhagens tumorais (AGP01, AGP01 *PIWIL1*<sup>-/-</sup>, ACP02 e ACP03) e linhagem não neoplásica de fibroblasto pulmonar humano (MRC5).

	AGP-01	AGP01 PIWIL1 <sup>-/-</sup>	ACP02	ACP03	MRC5
CI50	25.14	23.92	24.39	30.90	33.23
Intervalo de confiança	(18.94 -33.37)	(15.44-37.07)	(17.98-33.10)	(28.00-34.09)	(30.75-35.91)
R <sup>2</sup>	0.9596	0.9424	0.9620	0.9869	0.9925

**Fonte:** Dados obtidos por regressão não-linear, utilizando o software Graph Pad prism. 9. ND: não determinado. Intervalo de confiança de 95% (p<0,05) com linhagens tratadas com extrato etanólico de *Annona muricata*

**Tabela 2:** Valores da concentração da CI<sub>50</sub> (concentração inibitória média do crescimento celular em µg), com a realização do teste do MTT, após 72h de incubação tratadas com EAAM, para quatro linhagens tumorais (AGP01, AGP01 *PIWIL1*<sup>-/-</sup>, ACP02 e ACP03) e linhagem não neoplásica de fibroblasto pulmonar humano (MRC5).

	AGP-01	AGP01 PIWIL1 <sup>-/-</sup>	ACP02	ACP03	MRC5
CI50	27.63	24.43	20.38	22.12	30.41
Intervalo de confiança	(20.44-37.35)	(22.46-26.56)	(18.92-21.94)	(19.69-24.85)	(24.39-37.91)
R <sup>2</sup>	0,9531	0.9748	0.9945	0.9758	0.9348

**Fonte:** Dados obtidos por regressão não-linear, utilizando o software Graph Pad prism. 9. ND: não determinado. Intervalo de confiança de 95% (p<0,05) com linhagens tratadas com extrato acetônico de *Annona muricata*

## Discussão

Ambos os extratos apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens tumorais, caracterizando uma promissora bioatividade a ser analisada. Contudo, não houve diferença significativa entre os resultados dos extratos (acetônico e etanólico). Por conseguinte, a

linhagem ACP03 apresentou um maior valor na CI50 (Tabela 1), ou seja, foi necessária uma maior concentração do extrato etanólico para inibir pelo menos 50% das células. Ademais, as linhagens AGP01 e AGP01 *PIWILI*<sup>-/-</sup> apresentaram resultados semelhantes entre si em ambas substâncias (Tab. 01 e 02).

Dessa maneira, foi selecionada a linhagem AGP01 para dar continuidade aos experimentos, assim como a utilização do extrato etanólico, uma vez que ele apresentou um menor intervalo de confiança em relação a linhagem selecionada. As concentrações selecionadas para os testes foram o valor do CI50 (25 µg/mL), metade do valor da CI50 (12,5 µg/mL) e o dobro (50 µg/mL).

## Conclusão

Sendo assim, com os resultados apresentados, observa-se que potencial antineoplásico do extrato de *Annona Muricata* frente às linhagens celulares de ascite gástrica paraense. Desse modo, um composto se mostra com uma significativa bioatividade nas concentrações a partir de 19 µg/mL, tanto na linhagem AGP01 quanto na AGP01 *PIWILI*<sup>-/-</sup>. A substância não apresentou mudanças significativas sob influência do gene *PIWILI*. Desse modo, infere-se que sua aplicabilidade abrange tanto pacientes com o gene mutado quanto pacientes com o gene *PIWILI* selvagem.

## Referências

1. DADDIOUAISSA, D.; AMID, A. **Anticancer Activity of Acetogenins from Annona Muricata** *FruitArticle in International Medical Journal Malaysia*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/329423801>>.
2. Felisberto Y. dos S.; Santos C. D. P. C.; Caires P. T. P. R. C.; Bitencourt A. C. de O.; Mendes A. V. F. D.; Pinho J. M. B. de L.; de Oliveira R. A. L.; de Castro B. T.; e Oliveira P. M. R.; Santos J. M. **Câncer colorretal: a importância de um rastreio precoce**. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 13, n. 4, p. e7130, 6 abr. 2021.
3. INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022.
4. M.P., T. et al. **Cytotoxic and antitumor effects of annona muricata in pancreatic cancer cells** *Pancreas*, 2011.
5. NAIK, A. V.; SELLAPPAN, K. Assessment of Genotoxic potential of Annonacin and Annona muricata L. extracts on human breast cancer (MCF-7) cells. *Advances in Traditional Medicine*, v. 21, n. 4, 2021.
6. Yang, Chunhua, Sushma Reddy Gundala, Rao Mukkavilli, Subrahmanyam Vangala, Michelle D Reid, and Ritu Aneja. **"Synergistic Interactions among Flavonoids and Acetogenins in Graviola (Annona Muricata) Leaves Confer Protection against Prostate Cancer."**, 2015
7. Yajid AI, Ab Rahman HS, Wong MPK, Wan Zain WZ. **Potential Benefits of Annona muricata in Combating Cancer: A Review**. *Malays J Med Sci*. 2018 Feb;25(1):5-15. doi: 10.21315/mjms2018.25.1.2. Epub 2018 Feb 28.