



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**RUI MIGUEL CARVALHO SANTOS**

***Potencial terapêutico da  
Cymbopogon citratus na leucemia  
promielocítica aguda***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA/HEMATO-ONCOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO  
MESTRE ANA CRISTINA PEREIRA GONÇALVES**

**FEVEREIRO/2013**





**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

**RUI MIGUEL CARVALHO SANTOS**

***Potencial terapêutico da *Cymbopogon citratus* na leucemia promielocítica aguda***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA/HEMATO-ONCOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:**

**PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO**

**MESTRE ANA CRISTINA PEREIRA GONÇALVES**

**FEVEREIRO/2013**

## **Potencial terapêutico da *Cymbopogon citratos* na leucemia promielocítica aguda;**

Rui Miguel Santos;<sup>1</sup> Ana Cristina Gonçalves;<sup>1,2,3</sup> Vera Alves;<sup>1,4</sup> Artur Figueirinha;<sup>5,6</sup>

Maria Celeste Lopes;<sup>7,8</sup> Maria Teresa Batista;<sup>5,7</sup> Ana Bela Sarmiento Ribeiro;<sup>1,2,4,8</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; <sup>2</sup>Instituto de Biologia Molecular Aplicada/Bioquímica, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; <sup>3</sup>Centro de Investigação Meio-Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Portugal; <sup>4</sup>Instituto de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; <sup>5</sup>Centro de Estudos Farmacêuticos, Universidade de Coimbra, Portugal; <sup>6</sup>Departamento de Ambiente, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal; <sup>7</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal; <sup>8</sup>Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), Universidade de Coimbra, Portugal

### **CONTACTOS:**

Rui Miguel Carvalho Santos, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal  
rui.mcsantos@gmail.com

Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Biologia Molecular Aplicada e Clínica Universitária de Hematologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal – Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal  
absarmiento@fmed.uc.pt

Ana Cristina Pereira Gonçalves, Biologia Molecular Aplicada e Clínica Universitária de Hematologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal – Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal  
ac.goncalves@fmed.uc.pt

## RESUMO

A *Cymbopogon citratus* é uma planta nativa da Índia e as suas folhas são utilizadas na gastronomia tradicional, consumidas como uma bebida aromática e utilizadas na medicina popular. Os extratos desta planta demonstraram, entre outras, atividade antioxidante podendo ser utilizadas na prevenção do cancro. Contudo, o seu potencial terapêutico no cancro não está esclarecido.

Assim, com este trabalho pretende-se estudar o potencial terapêutico do *C. citratus* em leucemias, nomeadamente na Leucemia Promielocítica Aguda (LPMA), assim como alguns dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade.

Para o efeito, as células HL-60, obtidas de um doente com LPMA, foram cultivadas na ausência e na presença de vários extratos polifenólicos de uma infusão de *C. citratus*, a diferentes concentrações e por diferentes períodos de tempo. A proliferação e a viabilidade celular foram avaliadas pelo IC<sub>50</sub> recorrendo ao teste do azul de tripano. O tipo de morte celular foi analisado por microscopia ótica e citometria de fluxo (CF) com anexina V e IP. Alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade induzida pela *C. citratus* foram avaliados por CF nomeadamente a expressão das proteínas reguladoras da apoptose, as proteínas BCL-2, BAX, FAS, FAS ligando, Caspase 3 e p53. A participação da mitocôndria e do *stress* oxidativo foi analisada por CF, através da determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\psi_{mit}$ ) recorrendo à sonda fluorescente JC1, pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) utilizando as sondas DCFH<sub>2</sub>-DA e DHE, e dos níveis de glutatião reduzido (GSH) através do Alanjado de Mercúrio.

Os nossos resultados preliminares mostram que a infusão desta planta induz diminuição na viabilidade das células HL-60, de modo dependente da concentração, do tempo de incubação, e da fração polifenólica, com IC<sub>50</sub> entre 50 e 250 mg/ml, após 48h de incubação. A apoptose observada pode ser mediada pelo aumento de caspase 3 e FAS ligando. Estes resultados

foram confirmados por microscopia ótica, observando características morfológicas típicas de morte celular por apoptose. Por outro lado, estes compostos induzem aumento da expressão intracelular de anião superóxido, diminuição da expressão de GSH e perda de potencial de membrana mitocondrial, sendo estes efeitos dependentes do tipo de fração.

Assim, o nosso estudo sugere que os extratos polifenólicos da infusão de *C. citratus* poderão ser uma nova opção terapêutica na LPMA.

### **PALAVRAS-CHAVE**

*Cympogon citratus*; Leucemia Promielocítica Aguda; Apoptose; caspase; disfunção mitocondrial;

## ABSTRACT

*Cymbopogon citratus* is a native herb from India and its leaves are used in traditional cuisine, as aromatic drinks and in popular medicine. Extracts from this herb leaves have demonstrated, among others properties, efficiency against oxidative damage that could be used in cancer prevention. However, the therapeutic potential in cancer is not clear.

Therefore, the aim of this work is to evaluate the potential therapeutic of *C. citratus* in Leukemia, in particular Acute Promyelocytic Leukemia (APL), and understand some of the cytotoxic mechanisms involved.

For this purpose, HL-60 cell line, obtained from an APL patient, was cultured in absence and presence of *C. citratus* initial infusion and several polyphenolic extracts, for different periods of time.

Cell growth and viability were evaluated by the Trypan Blue assay and the efficacy of the drugs determined by the IC<sub>50</sub>. Cell death analysis was performed by morphological studies and by flow cytometry (FC), using annexin-V/propidium iodide incorporation. The mechanisms involved in *C. Citratus* cytotoxicity were analyzed by flow cytometry through the expression of proteins involved in apoptotic pathways, namely BCL-2, BAX, FAS, FAS ligand, Caspase 3 and p53. The mitochondria function and oxidative stress evaluation were analyzed by FC, through the determination of mitochondria membrane potential ( $\psi_{mit}$ ) using JC1 fluorescent probe, by the ROS production using DCFH<sub>2</sub>-DA e DHE fluorescent probe, and GSH levels using the Mercury Orange fluorescent probe.

Our preliminary results show that *C. citratus* induces a decrease in HL-60 cell viability in a dose, time and fraction composition dependent manner, with an IC<sub>50</sub> values ranging from 50 to 250  $\mu\text{g/ml}$ , after 48h of incubation. Caspase 3 and Fas ligand may be involved in apoptotic cell death.

The results were confirmed by optic microscopy with observation of apoptotic cell death morphologic changes. In the other hand, these compounds induce increasing superoxide anion expression, decreasing GSH levels and loss of mitochondria membrane potential, in a fraction composition dependent manner.

In summary, *C. citratus* polyphenolic extracts may be a new therapeutic option for treatment of APL.

**Key-words:**

*Cymopogon citratos*; Acute Promyelocytic Leukemia; Apoptosis; caspase; mitochondrial disfunction;

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_{mit}$  - Potencial de membrana mitocondrial

AKT - Proteína cinase B

AR - recetor de androgénios

ATRA - Ácido all-trans retinóico

Cy1 - Extratos polifenólicos de uma infusão de *Cimbopogon citratus*

DCFH-DA - Diclorofluores cin diacetato

DHE - Dehidrocostuslactona

ER - recetor de estrogénios

FAB - French-American-British

FacF - Fração de ácidos fenólicos

FF - Fração de fenóis

FITC - isotiocianato de fluoresceína

FT - Fração de taninos

GSH - Glutatião reduzido

IC<sub>50</sub> – concentração de fármaco capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%

IP - Iodeto de Propídeo

LMA - Leucemias mielóides agudas

LPMA - Leucemia promielócítica aguda

MAPK - Proteína cinase activada por mitogénios

MIF - Média de Intensidade de fluorescência

NF-  $\kappa$ B - Factor nuclear kappa B

OMS - Organização Mundial de Saúde

PARP - Poli-ADP-ribose proteolítica

PBS – Solução salina de tampão fosfato

PE - Ficoeritrina

ROS - Espécies reativas de oxigénio,

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

TCC - *American Type Culture Collection*

## 1. INTRODUÇÃO

O reconhecimento das propriedades terapêuticas das plantas remontam à antiguidade e, recentemente, têm despertado um considerável interesse na comunidade científica. Vários estudos têm demonstrado que os compostos presentes nas frutas e nos vegetais podem interferir em múltiplas vias de sinalização celular, modulando vias de proliferação, sobrevivência e apoptose. Estes compostos têm sido recomendados na prevenção de doenças crônicas como o cancro, mas a atividade molecular dos seus constituintes ativos ainda não é clara.<sup>(1)</sup> Estudos *in vitro* e *in vivo*, realizados em modelos animais, têm demonstrado que vários agentes quimiopreventivos naturais exercem um efeito inibidor na carcinogênese e na progressão tumoral. Acredita-se que estes efeitos são mediados pela regulação de vias de sinalização celular, nomeadamente através da modulação de proteínas e fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), a proteína cinase B (AKT), a proteína cinase ativada por mitogénios (MAPK), p53, recetor de androgénios (AR) e recetor de estrogénios (ER). A modulação destas vias de sinalização celular ativam sinais de morte celular e induzem apoptose em células pré-cancerígenas e cancerígenas, resultando na inibição do desenvolvimento e progressão do cancro. No entanto, são necessários mais estudos *in vivo* e *in vitro* para compreender melhor os mecanismos moleculares de ação dos compostos naturais como agentes quimiopreventivos.<sup>(2)</sup>

A *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, Poaceae – Gramineae, é uma planta nativa da Índia e as suas folhas são utilizadas na gastronomia tradicional, consumidas como uma bebida aromática e utilizadas na medicina popular.<sup>(3)</sup>

A infusão de folhas de *C. citratus* ou os flavonóides extraídos das folhas de *C. citratus* constituem, potencialmente, uma importante fonte de compostos com efeitos benéficos para a saúde humana.<sup>(4)</sup> Estes constituintes têm sido utilizados, nomeadamente, como agentes anti-hipertensivos e anti-espasmódicos.<sup>(5, 6)</sup> Em vários países a *C. citratus* é utilizada no tratamento

de quadros febris e como sedativos. Estudos epidemiológicos têm sublinhado a importância dos polifenóis no tratamento de doenças degenerativas e cardiovasculares.<sup>(6)</sup> Estudos com extratos de folhas de *C. citratus* demonstraram que os seus constituintes apresentam atividade diurética, vasorelaxante, hipotensiva e anti-inflamatória, sendo eficazes na prevenção da lesão oxidativa através das suas propriedades quimioprotetoras.<sup>(3, 7, 8)</sup> No entanto, as propriedades anticancerígenas da *C. citratus* não estão estudadas.

A atual classificação das Leucemias mielóides agudas (LMA) utiliza a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS),<sup>(9)</sup> que inclui diferentes grupos biologicamente distintos com base nas manifestações clínicas e nas anomalias citogenéticas e moleculares, além da morfologia. A classificação da OMS é a primeira classificação da LMA que incorpora informações genéticas (cromossômicas e moleculares). A LMA-M3 de acordo com a classificação French-American-British (FAB) é atualmente classificada como LPMA (Leucemia promielócítica aguda), com base na translocação t(15;17)(q22;q12) ou do produto do gene de fusão, a proteína PML/RAR $\alpha$ .<sup>(10)</sup>

O ácido all-trans retinóico (ATRA) e quimioterapia concomitante à base de antraciclina é um dos tratamentos mais efetivos da LPMA, resultando em taxas de remissão completa de 90 a 95%. Tendo em vista o progresso realizado na LPMA, resultando em altas taxas de cura, as metas terapêuticas agora consistem em identificar os doentes com risco muito baixo de recidiva, para os quais se procura diminuir a quantidade de terapia administrada, e em identificar doentes com maior risco de recidiva, a fim de desenvolver novas abordagens para melhorar as taxas de cura.<sup>(10)</sup> Além disso, a sua administração pode levar a efeitos secundários, como a síndrome do ATRA<sup>(11)</sup> e ao desenvolvimento em alguns doentes de resistência ao ATRA.<sup>(12)</sup>

Neste sentido, com o presente estudo pretendeu-se estudar o potencial terapêutico de extratos de *Cymbopogon citratus* na LPMA *in vitro*, assim como os mecanismos envolvidos na citotoxicidade.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

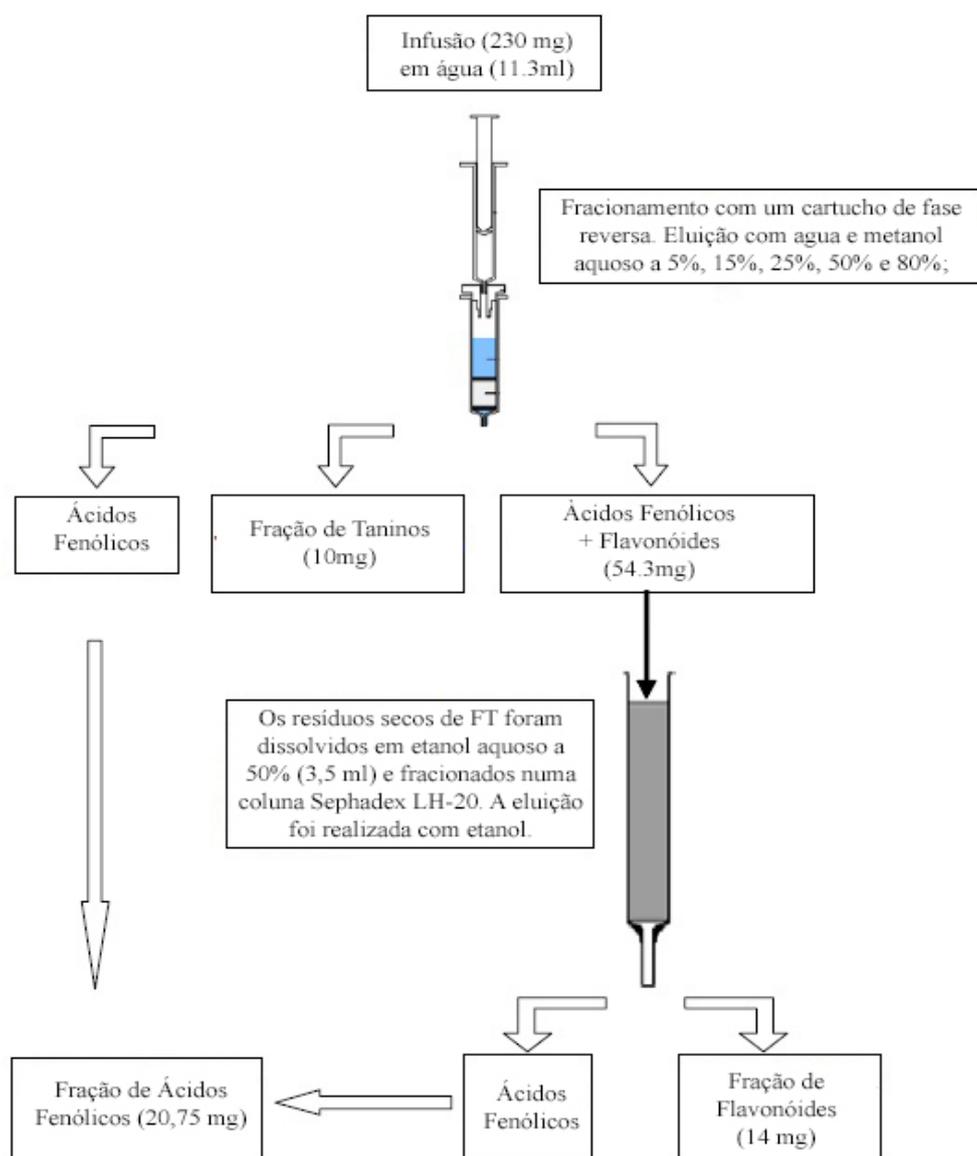
### **2.1. Materiais:**

Os extratos polifenólicos de uma infusão de *C. citratus* (Cy1) e três das suas frações principais, a fração de fenóis (FF), a fração de taninos (FT) e a fração de ácidos fenólicos (FacF) foram obtidos na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. A linha celular HL-60 foi obtida no *American Type Culture Collection* (ATCC), USA. O meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640), o teste de exclusão do azul de tripano, o alaranjado de mercúrio e Dehidrocostuslactona (DHE) foram comprados à Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A penicilina, a estreptomicina e o soro fetal bovino foram comprados à Gibco (Paisley, UK). O Iodeto de Propídeo (IP), o kit IntraCell e o anti-p53-FITC foram adquiridos na Immunostep (Salamanca, Espanha). O anti-BAX ligado à sonda fluorescente ficoeritrina (PE) e o anti-BCL-2 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram comprados à Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). O JC1 e o DCFH-DA foram adquiridos à Invitrogen (California, USA). O anti-FAS-FITC o anti-FAS ligando-PE e a anti-caspase 3 ativada-PE foram comprados a Becton Dickinson Biosciences (New Jersey, USA). O citómetro de fluxo FACSCalibur foi comercializado, também, pela Becton Dickinson.

### **2.2. Métodos:**

#### **2.2.1. Obtenção dos extratos polifenólicos:**

O Cy1, FF, FT e FacF foram obtidos através de fracionamento (Figura 1) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, como descrito por Figueirinha *et al.*<sup>(4)</sup>



**Figura 1** – Esquema do processamento utilizado para o fracionamento da infusão de folhas de *Cymbopogon citratus* (Adaptado de Figueirinha, A, 2008).<sup>(4)</sup>

### 2.2.2. Cultura de Células:

De modo a estudar o potencial efeito citotóxico e citostático do *C. citratus* na Leucemia Promielocítica Aguda (LPMA), foi utilizada a linha celular HL-60, obtida no *American Type Culture Collection* (ATCC), USA. As células HL-60 foram mantidas em cultura em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) (Sigma) a pH 7.4, contendo 2 mM de L-glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1.5 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100

$\mu\text{g/mL}$  estreptomicina (Gibco) e enriquecido com soro fetal bovino (Gibco) a 10%. As células foram propagadas e mantidas em cultura no meio apropriado à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  numa atmosfera humedecida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , iniciando-se a cultura a uma densidade de 0.3 a 0.5 milhões de células por mL.

### **2.2.3. Avaliação da proliferação e a viabilidade celular:**

O efeito dos extratos polifenólicos da infusão de *C. citratus* (frações Cy1, FF, FT e FacF) na densidade e na viabilidade celular foi avaliada a cada 24 horas, pelo teste de exclusão do azul de tripano (Sigma), durante um período total de 72 horas. Assim, as células HL-60 foram cultivadas na ausência (controle) e na presença de concentrações crescente dos diferentes extratos de *C. citratus*, numa gama de concentrações entre  $1 \mu\text{g/mL}$  e  $1.000 \mu\text{g/mL}$ . Cada ensaio representa a média de 4 leituras e foram realizados 3 ensaios independentes. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experiências independentes.

### **2.2.4. Análise do tipo de Morte celular:**

O tipo de morte celular induzido pelos extratos de *C. citratus* foi analisado por microscopia ótica e citometria de fluxo com recurso à dupla marcação anexina V e iodeto de propídeo, nas células HL-60 incubadas na ausência (controle) e na presença de  $200\mu\text{g/ml}$  de Cy1,  $250\mu\text{g/ml}$  de FacF,  $50\mu\text{g/ml}$  de FF e  $75\mu\text{g/ml}$  de FT.. A análise das características morfológicas das células HL-60, incubadas na ausência e na presença dos extratos em estudo foi analisada por microscopia ótica após realização de esfregaços de células e coloração dos mesmos com corante de May-Grünwald-Giemsa. Assim, os esfregaços obtidos foram corados durante 3 minutos com solução de May-Grünwald e seguidamente com solução de Giemsa durante 15 minutos. A morfologia das células foi analisada por microscopia ótica a uma ampliação de 500x e posteriormente fotografada recorrendo-se a um microscópio ótico Nikon Eclipse 80i

acoplado a uma câmara digital Nikon Digital Câmara DXm 1200F. Paralelamente, realizaram-se os estudos de morte celular por citometria de fluxo. Assim, 1 milhão de células incubadas na ausência e na presença dos extratos na concentração acima indicada, foram recolhidas e lavadas com tampão fosfato (PBS) por centrifugação durante 5 minutos a 1.000 xg. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão de ligação frio e incubado com 5 µL de anexina V-FITC e 5 µL de IP (Apoptosis Detection Kit, Immunostep) durante 15 minutos ao abrigo da luz. Adicionou-se mais 400 µL de tampão de ligação e procedeu-se à análise num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). A discriminação das células expostas simultaneamente à anexina V e ao IP resulta na identificação de células viáveis (não marcadas com anexina V e IP), de células em apoptose inicial (marcadas com anexina V e negativas para o IP), de células em apoptose tardia/necrose (marcadas simultaneamente com anexina V e IP) e de células em necrose (marcadas com IP). Os resultados são expressos em percentagem de células de cada uma das subpopulações identificadas com base na positividade e/ou negatividade de marcação para anexina V e/ou para o IP, sendo os resultados expressos em % ± desvio padrão.

### **2.2.5. Avaliação dos mecanismos moleculares de morte celular:**

A avaliação de moléculas relacionadas com a morte celular permite avaliar alguns dos mecanismos envolvidos no efeito citotóxico induzido pelos extratos de *C. citratus*. Através da citometria de fluxo, e recorrendo à utilização de anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes, foram analisados os níveis de expressão das proteínas pro-apoptóticas FAS, FAS ligando, BAX e caspase 3 ativada, da anti-apoptótica, BCL-2, e da proteína reguladora do ciclo celular p53. Para tal, 1 milhão de células da linha celular HL-60 incubadas nas condições referidas anteriormente, foram lavadas com PBS, pH 7,4, durante 5 minutos a 300xg. A avaliação da expressão intracelular destas proteínas iniciou-se pela fixação das

mesmas com recurso ao kit IntraCell (Immunostep). Assim, as células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz, com 100 µL da solução A (solução de fixação). Após lavagem com PBS, as células foram incubadas durante 15 minutos no escuro, com 100 µL da solução B (solução de permeabilização) e com 1 µg dos respetivos anticorpos, anti-BAX ligado à sonda fluorescente ficoeritrina (PE) (Santa Cruz Biotechnology), anti-BCL-2 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Santa Cruz Biotechnology), anti-p53-FITC (Immunostep), anti-FAS-FITC (BD Biosciences), anti-FAS ligando-PE (BD Biosciences) e anti-caspase 3 ativada-PE (BD Biosciences). Por fim, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300xg durante 5 minutos, ressuspensas no mesmo tampão e analisadas no citómetro de fluxo. Os resultados são expressos em Média de Intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três ensaios independente.

#### **2.2.6. Análise do potencial de membrana mitocondrial e do stresse oxidativo:**

De modo a avaliar a participação da mitocôndria e do stresse oxidativo na morte celular induzida pelos extratos de *C. citratus*, avaliou-se o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{mit}$ ) a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), através da análise da produção intracelular de peróxidos e de anião superóxido, e os níveis de glutatião reduzido (GSH), em células HL-60 incubadas na ausência e na presença dos extratos de *C. citratus*, durante um período de 48 horas.

O  $\Delta\Psi_{mit}$  foi avaliado por citometria de fluxo através da utilização da sonda fluorescente JC1, que é um catião lipofílico que atravessa facilmente as membranas biológicas acumulando-se no interior da mitocôndria. Quando ocorre diminuição do  $\Delta\Psi_{mit}$  ou seja quando a membrana mitocondrial se encontra despolarizada, a sonda JC1 permanece no citoplasma sob a forma monomérica (M) exibindo fluorescência verde. Quando o  $\Delta\Psi_{mit}$  aumenta os monómeros de

JC1 entram na mitocôndria formando agregados (A) que exibem fluorescência vermelha.<sup>(13)</sup> Assim, o  $\Delta\Psi_{mit}$  é determinada pela razão entre a intensidade de fluorescência verde e vermelha, ou seja, pela razão M/A. Assim, 1 milhão de células de cada suspensão celulares foi incubada durante 15 minutos a 37°C, em atmosfera apropriada e ao abrigo da luz, com 5 µg/mL de JC1 (Molecular Probes, Invitrogen), Após incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 400 µL do mesmo tampão.

De modo a analisar a produção de peróxidos e de anião superóxido, 1 milhão de células foi incubadas durante 45 e 15 minutos a 37°C em atmosfera apropriada e ao abrigo da luz, respetivamente com 5 µM de DCFH-DA (Molecular Probes, Invitrogen) e com 5 µL de DHE (Sigma-Aldrich). A análise da produção de GSH foi realizada por incubação durante 3 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 40 µM de alaranjado de mercúrio (Sigma-Aldrich). Após incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos, ressuspensas em 400 µL do mesmo tampão e analisadas no citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson).

### **2.2.7. Análise estatística:**

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado utilizando os programas Microsoft Excell 2007 e GraphPad, versão 5. Na análise estatística recorreu-se aos testes *t-student*, ANOVA e ANOVA de medidas repetidas, considerando-se um nível de significância de 95% ( $p < 0.05$ ).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Avaliação da Viabilidade e Proliferação celular:

Para estudar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos dos extratos de *C. citratus* em células de Leucemia Promielocítica Aguda (LPMA), estudou-se os efeitos das frações Cy1 (extrato bruto), FF (fração flavonóide), FT (Fração de taninos) e FacF (Fração de ácidos fenólicos), na viabilidade e na proliferação das células HL-60.

Os nossos resultados mostram que os extratos polifenólicos obtidos da infusão da planta *C. citratus* induzem diminuição da proliferação (Figura 2-A) e da viabilidade celular (Figura 2-B) de modo dependente da concentração, do tempo de incubação e da fração polifenólica, sendo o seu efeito mais acentuado a partir das 48h de incubação (Figura 2). Contudo, a fração FT apresenta um efeito mais precoce, uma vez que o IC<sub>50</sub>, ou seja a concentração de fármaco necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%, pode ser atingido logo às 24h nas células tratadas com 750 µg/ml de FT. Por outro lado, a diminuição da viabilidade celular ocorre para concentrações superiores a 1 µg/ml na presença das frações FF, FT e FacF e para concentrações superiores a 50 µg/ml na presença da fração Cy1. Além disso, na Figura 2-B podemos verificar que, após 72 horas de incubação, todas as concentrações das frações testadas superiores a 1 µg/ml induzem redução da viabilidade das células HL-60 de cerca de 100%, exceto a fração Cy1, em que tal efeito só é observado para concentrações superiores a 50 µg/ml. Quando as células HL-60 foram incubadas na presença de 1 µg/ml das frações em estudo, não se observou efeito citotóxico (Figura 2-B) ou citostático (Figura 2-A) significativo, permanecendo a viabilidade celular, aproximadamente entre os 80% e os 90%.

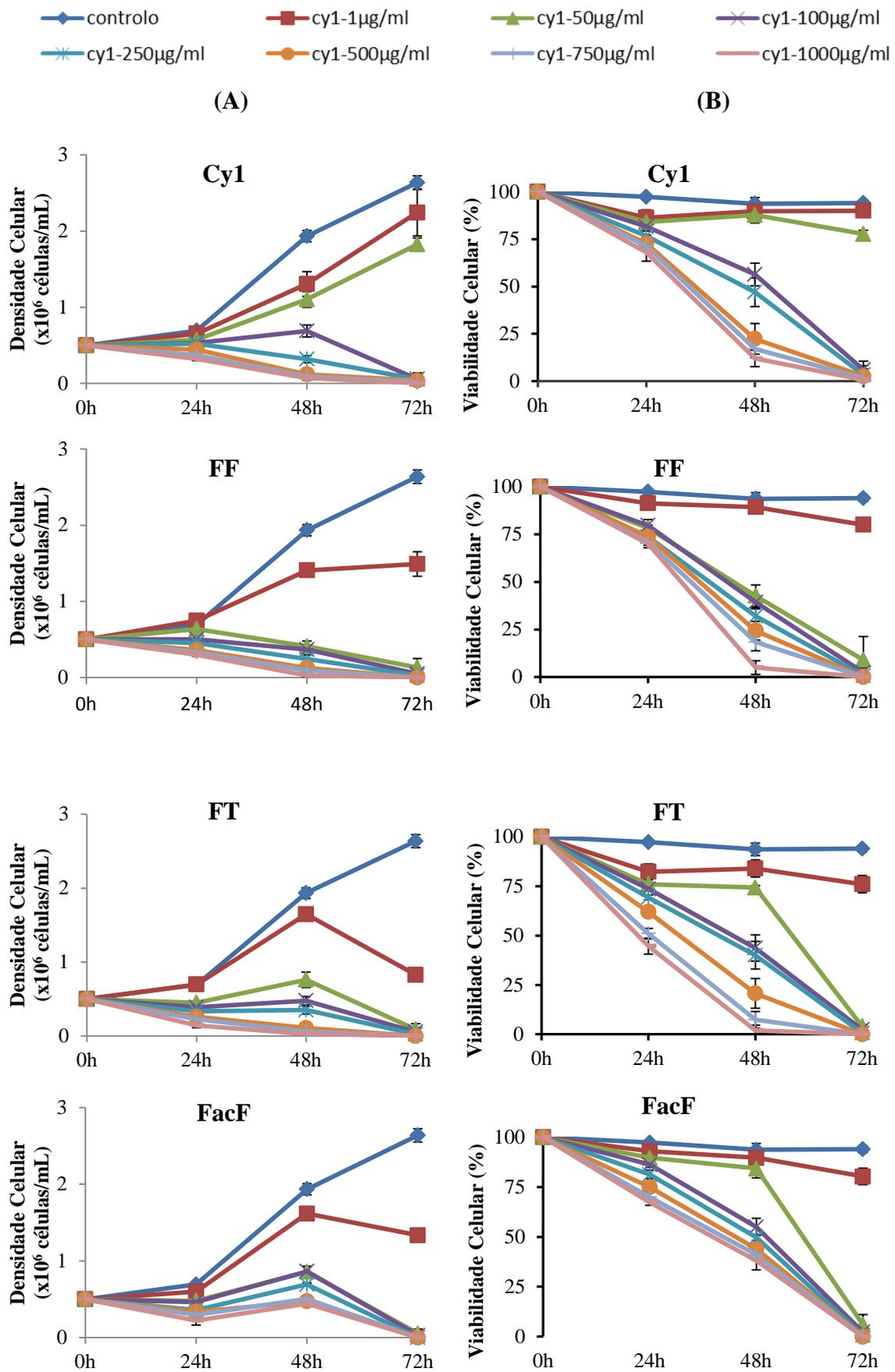


Figura 2: - Efeito das frações polifenólicas de *Cymbopogon citratus* Cy1, FF, FT e FacF na proliferação (A) e viabilidade (B) das células HL-60. As células HL-60 foram incubadas numa densidade inicial de

0,5x10<sup>6</sup>células/ml durante 72horas, com Cy1, FF, FT e FacF nas concentrações indicadas na figura. A densidade (A) e a viabilidade (B) foram avaliadas em intervalos de 24 horas, de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. O número de células em A representa exclusivamente as células viáveis. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 experiências independentes.

De modo a determinar o IC<sub>50</sub> no final de 48 horas de incubação com os diferentes extratos de *cymbopogon citratus*, efetuou-se a regressão não linear do Log da concentração (µg/ml) em função da percentagem de viabilidade celular. Como se pode observar na figura 3, o IC<sub>50</sub> depende do extrato de *C. citratus*, sendo para fração FF de 50 µg/ml, para a FT de 75 µg/ml, para a fração Cy1 de 200 µg/ml e FacF de 250 µg/ml. Assim, a fração FF parece ser a mais eficaz na indução de efeito citotóxico e citostático, uma vez que o IC<sub>50</sub> é atingido com menor concentração. Por outro lado, quando as células HL-60 são incubadas com as frações Cy1 e FacF é necessário concentrações 4 e 5 vezes superiores, respetivamente, para alcançar o mesmo efeito citotóxico (Figura 3). Contudo, a fração FT apresenta um efeito mais precoce, uma vez que o IC<sub>50</sub>, pode ser atingido logo às 24h, como mencionado (Figura 2).

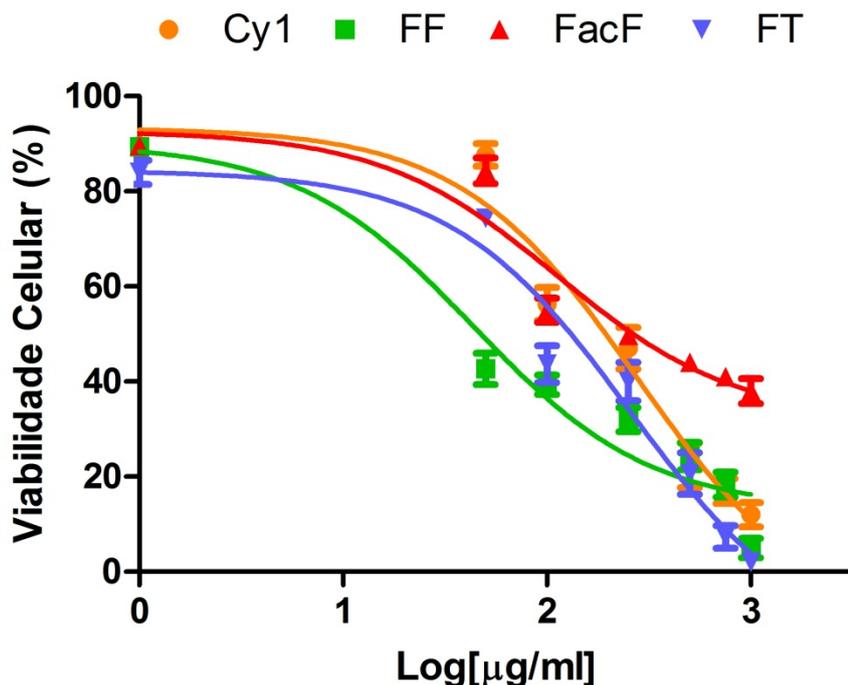


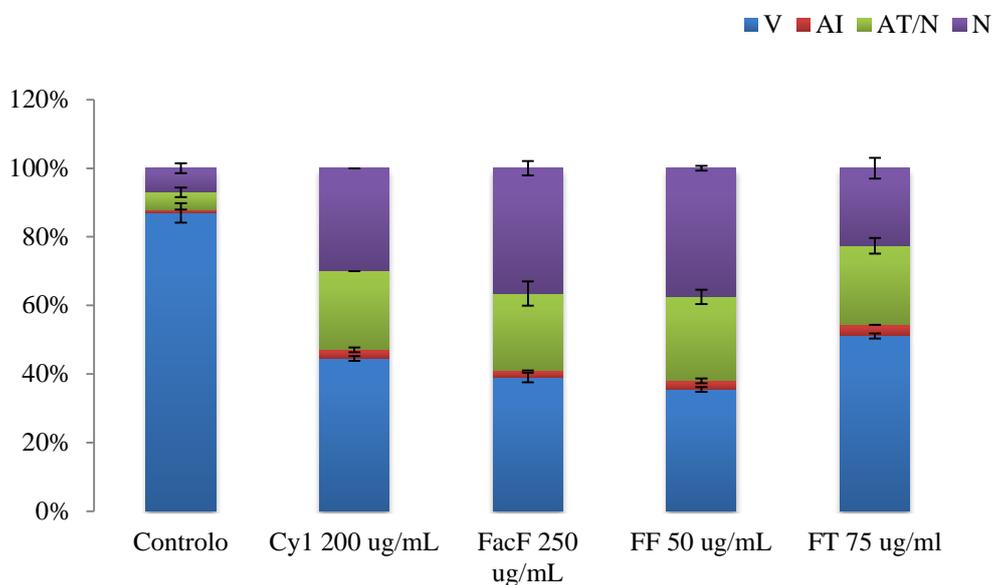
Figura 3 – Determinação do IC<sub>50</sub> dos extratos de *Cymbopogon citratus*, Cy1, FF, FT e FacF, nas células HL-60. O IC<sub>50</sub>, após 48 horas de incubação com os extratos polifenólicos de *C. citratus*, foi calculado através da regressão não linear do Log da concentração (μg/ml) em função da percentagem (%) de viabilidade celular.

### 3.2. Avaliação da morte celular:

Para avaliar o tipo de morte celular induzida pelos extratos de infusão de *C. citratus* nas células HL-60 recorreu-se à citometria de fluxo, através da dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo (Figura 4), e à microscopia ótica, por análise das características morfológicas, após realização de esfregaços corados com solução de May-Grünwald-Giemsa (Figura 5).

Como se pode observar na Figura 4, as diferentes frações de *C. citratus*, conduzem a diminuição da viabilidade celular, induzindo morte celular sobretudo por apoptose tardia (AT) e necrose (N), de modo dependente da fração.

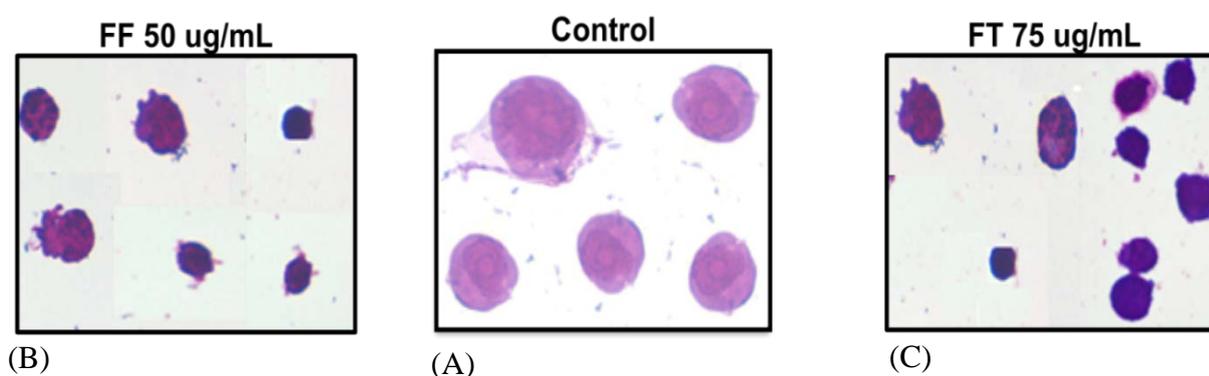
Assim, e de acordo com os resultados obtidos anteriormente, a fração FF é a que induz diminuição da viabilidade celular e aumento da percentagem de células mortas por apoptose tardia/necrose (AT/N, 24,5%) e necrose (N, 37,5%), mais acentuada (total de 62% de células mortas) relativamente às outras frações. A fração FacF induziu morte celular por apoptose tardia/necrose e por necrose em cerca de 58% das células HL-60 (22,5% mais 36,5%, respetivamente), enquanto nas células tratadas com as frações Cy1 e FT, a soma da percentagem de células em apoptose tardia e necrose foi aproximadamente de 50% e 40%, respetivamente.



**Figura 4 – Análise da morte celular induzida pelas frações da infusão de *C. citratus* na linha celular HL-60, através de citometria de fluxo.** A morte celular foi detetada pela dupla marcação Anexina V e iodeto de propídio e analisada por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em % de células viáveis (V), em apoptose tardia/necrose (AT/N), em necrose (N) e em apoptose inicial (AI). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experiências independentes.

Para confirmar os resultados obtidos relativamente ao tipo de morte celular, analisou-se a morfologia das células por Microscopia Ótica, após realização de esfregaços corados com May-Grünwald-Giemsa (Figura 5).

Os estudos morfológicos representados na Figura 5 estão de acordo com os estudos de morte celular efetuados por citometria de fluxo. Como se pode verificar, nas células tratadas com as frações de *C. citratus*, a maioria das células apresenta características típicas de estádios avançados de morte celular por apoptose, nomeadamente diminuição do volume celular, condensação e fragmentação da cromatina, “blebbing” e formação de corpos apoptóticos (Figura 5-B e C).



**Figura 5 – Aspectos morfológicos das células HL-60 incubadas na ausência e na presença dos extratos de *Cymbopogon citratus*.** As células HL-60 foram mantidas em cultura durante 48 horas na ausência (controlo) (A) e na presença de FF 50  $\mu\text{g/ml}$  (B) e FT 75  $\mu\text{g/ml}$  (C). Após este período, efetuaram-se esfregaços das células e coloração com May-Grünwald-Giemsa. As células foram observadas ao microscópio ótico a uma ampliação de 500x.

### 3.3. Avaliação dos mecanismos envolvidos na morte celular:

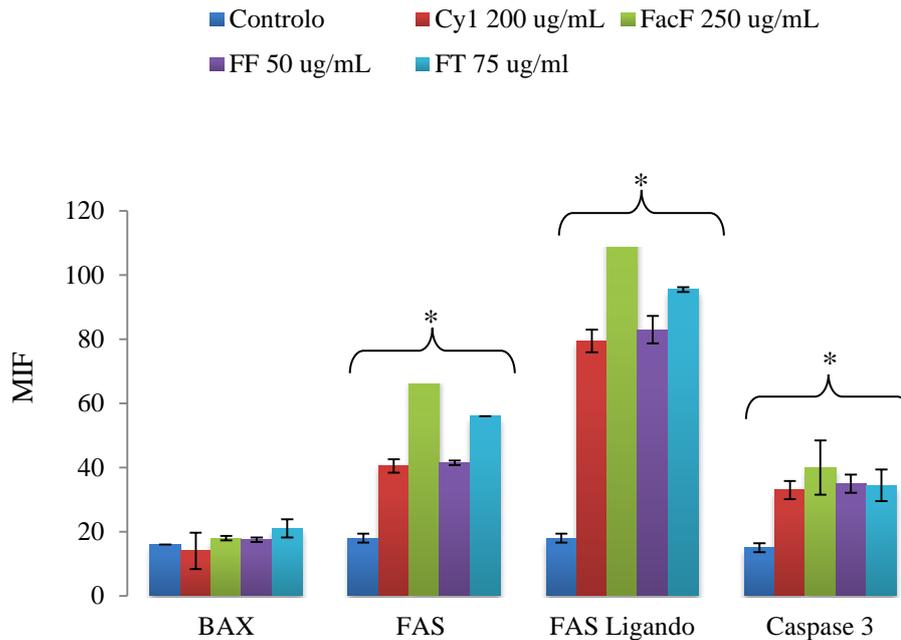
Posteriormente avaliou-se alguns dos mecanismos envolvidos na morte celular induzida pelos compostos em estudo nas células HL-60, nomeadamente a expressão de proteínas pró-apoptóticas como a BAX, FAS/FASL e caspase 3 (Figura 6).

Assim, e de modo a confirmar que os extratos de *C. citratus* induziam apoptose dependente de caspases analisaram-se os níveis de expressão da caspase 3 ativada, a caspase efetora da

apoptose. Como se pode observar na figura 6, na presença das quatro frações polifenólicas observou-se um aumento médio significativo de 2,4x na expressão de caspase 3 ativada nas células tratadas comparativamente às células controlo.

Tal como observado para a expressão de caspase 3 ativada, as células incubadas na presença de FacF, FT, FF e Cy1 apresentam aumento significativo da expressão de FAS ( $p < 0,05$ ), sendo este aumento, respetivamente, de 3,8x, 3,1x e 2,3x (FF e Cy1) superior, relativamente às células de controlo. Do mesmo modo, quando as células HL-60 foram incubadas na presença dos vários compostos em estudo, observou-se aumento significativo da expressão de FAS ligando ( $p < 0,05$ ), sendo este aumento de 4,4x, 6,2x, 4,6x e 5,3x, respetivamente na presença das frações Cy1, FacF, FF e FT, comparativamente às células incubadas na ausência dos compostos (controlo).

Por outro lado, apesar de se ter observado um ligeiro aumento da expressão de BAX nas células incubadas com os diferentes extratos de *C. citratus*, com exceção das células tratadas com Cy1 em que se observa uma ligeira diminuição da expressão, relativamente ao controlo, os resultados não são estatisticamente significativos (Figura 6).



**Figura 6 – Análise da expressão de proteínas moduladoras da apoptose na linha celular HL-60 na presença das frações de *C. citratus*.** As células foram incubadas durante 48h na presença e na ausência das frações Cy1, FacF, FF e FT e a expressão de BAX, FAS, FASL e Caspase 3 foi determinada por citometria de fluxo recorrendo a anticorpos monoclonais como descrito na seção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias de média de intensidade de fluorescência (MFI) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experiências independentes. (\*  $p < 0.05$ )

### 3.4. Análise dos níveis de expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS):

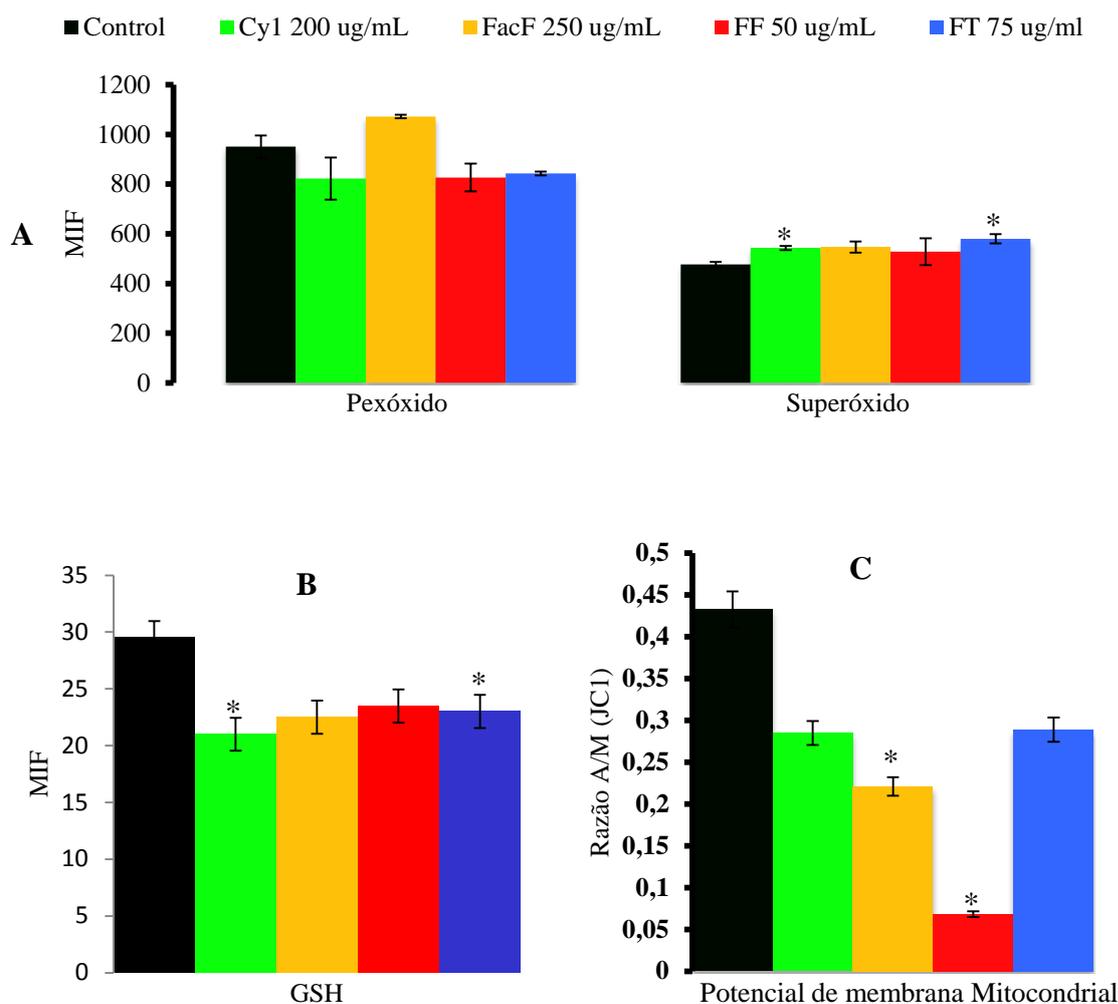
Os compostos naturais, dependendo da concentração em que se encontram no organismo, podem exercer efeitos antioxidantes e/ou pró-oxidantes, e estes efeitos poderão estar relacionados com a indução de stresse oxidativo. O stresse oxidativo tem sido implicado no crescimento e na morte celular de células neoplásicas, pelo que se estudou a expressão intracelular de peróxidos ( $H_2O_2$ ), anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), e da defesa antioxidante não

enzimática glutatíon reduzido (GSH), nas células HL-60 incubadas na ausência e na presença destes compostos (Figura 7).

Na figura 7-A observa-se que as quatro frações da infusão de *C. citratus* não induzem alterações significativas na expressão de peróxidos nas células HL-60 tratadas com estes compostos. No entanto, a expressão do anião superóxido aumentou significativamente na presença da fração Cy1 e FT, sendo este aumento de 1,1x e 1,2x, respetivamente.

Por outro lado, observou-se diminuição dos níveis intracelulares da defesa antioxidante não enzimática, GSH (Figura 7-B), em todas as condições testadas, sendo esta diminuição estatisticamente significativa na presença dos extratos Cy1 e FT.

Por fim, e de modo a avaliar se os compostos em estudo induzem alteração na função mitocondrial, determinou-se o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{mit}$ ) através da razão agregados/monómeros de JC1. Como se pode observar na figura 7-C, os compostos em estudo induzem diminuição da razão entre agregados e monómeros (A/M) de JC1, que se traduz na diminuição de potencial de membrana mitocondrial, característico de células em apoptose. A perda de potencial de membrana mitocondrial foi estatisticamente significativa quando as células HL-60 foram incubadas na presença da fração FF e FacF (razão A/M de 0,07 e 0,22, respetivamente).



**Figura 7 –Análise dos níveis de expressão de espécies reativas de oxigênio, peróxidos e anião superóxido, da defesa antioxidante GSH e do potencial de membrana mitocondrial nas células HL-60, na presença de frações polifenólicas de *C. citratus*, por citometria de fluxo.** As células foram incubadas durante 48h na presença e na ausência das frações Cy1, FacF, FF e FT. Os níveis de peróxidos, anião superóxido, de GSH e do potencial de membrana mitocondrial foram avaliados por citometria de fluxo recorrendo à marcação com as sondas DCFH2-DA, DHE, Alaranjado de Metilo e JC1 (razão A/M), como descrito na seção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias de média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experiências independentes. (\*  $p < 0.05$ )

#### 4. DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

O cancro é largamente determinado pelo ambiente, sendo a dieta uma variável muito importante. Os padrões alimentares, os alimentos, os nutrientes e outros constituintes da dieta estão intimamente relacionados com o risco de desenvolver diversos tipos de cancro, e, neste sentido, foi estimado que 35% das mortes por cancro podem estar relacionadas com fatores dietéticos.

Por outro lado, os produtos naturais como fonte de novas estruturas, mas não necessariamente o fármaco final, continuam a ter grande utilidade. Contudo, no que diz respeito a fármacos anticancerígenos, no período compreendido entre a década de 1940 até ao presente, das 155 pequenas moléculas disponíveis, 73% não são sintéticas e 47% são produtos naturais/derivados de produtos naturais. A análise das fontes de novos fármacos e de fármacos aprovados para o tratamento de doenças humanas revela que os produtos naturais continuam a desempenhar um importante papel na investigação e desenvolvimento de novos fármacos.<sup>(14)</sup>

Recentemente, os polifenóis dietéticos receberam muita atenção pelos seus benefícios na saúde, devido às suas propriedades anticancerígenas.<sup>(15)</sup> Os compostos polifenólicos constituem um dos mais numerosos grupos do reino *Plataee* e podem ser divididos em várias classes com base na sua estrutura molecular, sendo os flavonoides um dos principais grupos.<sup>(16)</sup>

Os nossos resultados mostram que os extratos obtidos a partir da infusão desta planta, as frações Cy1, FF, FT e FacF, induzem diminuição da viabilidade e da proliferação das células HL-60, de modo dependente da concentração, do tempo de incubação, e da fração polifenólica, com IC<sub>50</sub> entre 50 e 250 mg/ml, após 48h de incubação. Destes compostos a fração de flavonoides (FF) é a que apresenta maior potencial citotóxico nas células de Leucemia Promielocítica Aguda, seguida da fração dos ácidos fenólicos (FacF), pelo extrato bruto (Cy1) e por fim a fração de taninos (FT). A fração Cy1, que representa o extrato bruto

da infusão de *C. citratus*, e que contém os restantes produtos de fracionamento, apresenta efeito citotóxico e citostático inferior ao observado para os fracionamentos FF e FacF. Estes resultados sugerem que o processo de fracionamento da infusão de *C. citratus* utilizado consegue produzir frações com maior potencial anticancerígeno do que a infusão original. Em estudos anteriores, Francisco *et. al* (2011<sup>(17)</sup>) demonstrou que o efeito anti-inflamatório destes extratos de *C. citratus* numa linha celular de macrófagos murinos é sobretudo devido às frações de ácidos fenólicos e dos taninos através da inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e da diminuição da expressão de iNOS com conseqüente diminuição da produção de óxido nítrico. No entanto, os nossos resultados evidenciam que os efeitos citotóxicos e citostáticos destes extratos são sobretudo da fração dos flavonoides.

Vários estudos demonstraram o efeito anticancerígeno de flavonoides em células de neoplasias hematológicas. Por exemplo, estudos conduzidos por Hirano (1994<sup>(18)</sup>) mostraram que oito dos vinte e oito flavonoides estudados apresentam efeito citostático considerável na linha celular HL-60. Entre os compostos estudados, a genisteína, o honoquiol, a machilina A, o matairesinol e a arctigenina induziram efeito citotóxico com IC<sub>50</sub> de 100 mg/ml<sup>11</sup>. No presente estudo, a fração de flavonoides foi a que apresentou maior potencial citotóxico obtendo-se o IC<sub>50</sub> mais precocemente e com menor dose (50 mg/ml).

A relação entre apoptose e cancro tem sido enfatizada com o aumento de evidência sugestiva da relação entre o processo de transformação neoplásica, a progressão e a metastização e a alteração das vias normais de apoptose.<sup>(19)</sup>

A apoptose é um mecanismo ativo de morte celular programada, que ocorre em situações fisiológicas e patológicas, distinto da morte celular passiva, a necrose. As características morfológicas deste processo incluem a retração do volume celular, “blebbing” da membrana plasmática, e condensação da heterocromatina periférica, seguida por clivagem do núcleo e do

citoplasma em múltiplos corpos membranares, que contêm fragmentos de cromatina (corpos apoptóticos),<sup>(20)</sup> semelhantes as alterações que observamos por microscopia ótica.

A capacidade de indução de apoptose, por agentes quimiopreventivos naturais, em linhas celulares de leucemia, nomeadamente nas células HL-60, através da indução rápida da atividade da caspase-3, da estimulação da Polimerase de clivagem de poli-(ADP-ribose) proteolítica (PARP), da despolarização da membrana mitocondrial e da elevação de espécies reativas de oxigénio (ROS), têm sido descrita por vários autores.<sup>(2, 21-23)</sup>

Além do efeito antiproliferativo, os extratos da infusão de *C. citratus* induziram, neste estudo, morte celular por apoptose nas células HL-60, sendo esta mediada por ativação da Caspase3. Além disso, o aumento da expressão de FAS e FAS ligando e a diminuição do potencial de membrana mitocondrial observado, sugerem que os compostos estudados induzem apoptose nas células HL-60 por ativação da via extrínseca e intrínseca. O envolvimento da disfunção mitocondrial na citotoxicidade induzida por compostos obtidos de plantas do género *Cymbopogon*, já tinha sido descrito para os óleos essenciais de *Cymbopogon Flexuosos* em particular o seu constituinte principal, o isoentermedeol.<sup>(22)</sup>

O estudo da cadeia respiratória mitocondrial e da produção de ATP poderia ser útil para a melhor compreensão da participação da mitocôndria na citotoxicidade induzida pelos extratos de *C. citratus*. Além disso, o efeito antiproliferativo dos compostos em estudo deverá ser confirmado pela análise do ciclo celular.

Em suma, o nosso estudo sugere que os extratos polifenólicos da infusão de *Cymbopogon citratus* poderão ser uma nova opção terapêutica na Leucemia Promielocítica Aguda em monoterapia, abrindo novas perspectivas de tratamento neste tipo de leucemias. Além disso, a associação destes compostos com novos fármacos e/ou com a quimioterapia convencional poderá ser útil permitindo a redução da toxicidade secundária e melhoria da qualidade de vida dos doentes. Contudo, só a confirmação do seu potencial citotóxico e

citostático *in vivo* e a avaliação da biodistribuição destes compostos, através da sua marcação radioativa em modelos animais, permitirá traçar perfis de toxicidade e vias de administração eficazes que proporcionará um conhecimento mais aprofundado sobre estes compostos e poderá potenciar o desenvolvimento da sua produção sintética com objetivos terapêuticos.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000 12//;73(3):347-77.
2. Sarkar FH, Li Y. Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004 11/2//;555(1–2):53-64.
3. Carbajal D, Casaco A, Arruzazabala L, Gonzalez R, Tolon Z. Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 1989 2//;25(1):103-7.
4. Figueirinha A, Paranhos A, Pérez-Alonso JJ, Santos-Buelga C, Batista MT. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*. 2008 10/1//;110(3):718-28.
5. Borrelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*. 2000;14(8):581-91.
6. Gupta MP, Farmacéutica CSdQF, Bello SEPdCA. 270 plantas medicinales Iberoamericanas: Convenio Andrés Bello; 1995.
7. Cápiro N, Sánchez-Lamar Á, Fonseca G, Baluja L, Borges E. Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2001;20:34-7.
8. Runnie I, Salleh MN, Mohamed S, Head RJ, Abeywardena MY. Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in isolated rat aorta and mesenteric vascular bed. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004 6//;92(2–3):311-6.
9. Swerdlow SH, Cancer IAfRo, Organization WH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues: International Agency for Research on Cancer; 2008.

10. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition: McGraw-Hill Education; 2011.
11. Chomienne C, Fenaux P, Degos L. Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *The FASEB journal*. 1996;10(9):1025-30.
12. Gallagher R. Retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;16(10):1940-58.
13. Yao J, Jiang Z, Duan W, Huang J, Zhang L, Hu L, et al. Involvement of Mitochondrial Pathway in Triptolide-Induced Cytotoxicity in Human Normal Liver L-02 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2008;31(4):592-7.
14. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of natural products*. 2007;70(3):461-77.
15. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008;52(5):507-26.
16. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2007 7//;18(7):427-42.
17. Francisco V, Figueirinha A, Neves BM, García-Rodríguez C, Lopes MC, Cruz MT, et al. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011 1/27//;133(2):818-27.
18. Hirano T, Gotoh M, Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sciences*. 1994 //;55(13):1061-9.
19. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical Oncology*. 1997 11//;6(3):133-42.

20. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell Death: The Significance of Apoptosis. In: G.H. Bourne JFD, Jeon KW, editors. *International Review of Cytology*. Volume 68: Academic Press; 1980. p. 251-306.
21. Tikoo K, Sane MS, Gupta C. Tannic acid ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity and potentiates its anti-cancer activity: Potential role of tannins in cancer chemotherapy. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011 3/15/;251(3):191-200.
22. Kumar A, Malik F, Bhushan S, Sethi VK, Shahi AK, kaur J, et al. An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2008 2/15/;171(3):332-47.
23. Döchler M, Stepnik M. Cytotoxic effects of a combination of three natural compounds to leukemia cells in vitro. *Cancer Therapy*. 2008;6:733-40.