



INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO ARTEPELIN C

Queila Susana Gambim Kotzal¹
Francisco Adalberto do Nascimento Paz²
Rafael Rodrigues Dihl³

Resumo

O uso de plantas como terapia para vários problemas de saúde é uma prática milenar. Muitos são os estudos que fazem alusão ao uso medicinal de plantas que já eram utilizadas pelos povos da antiguidade. Entretanto, ensaios para avaliação da atividade genotóxica das plantas usadas pela população são necessários e importantes para estabelecer medidas de controle quanto ao uso indiscriminado. Dentre uma grande variedade de plantas usadas com fim medicinal, encontra-se a *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica mais importante para a obtenção de uma própolis brasileira, chamada de própolis verde. Estudos fitoquímicos têm demonstrado que o Artepelin C é um dos principais componentes bioativos da própolis brasileira. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a ação mutagênica do Artepelin C em uma linhagem celular humana metabolicamente competente (HepG2). Para tanto, foi utilizado o teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN), que detecta eventos de alterações cromossômicas e citotoxicidade. Os resultados preliminares demonstraram que altas concentrações do Artepelin C estão associadas com inibição da proliferação celular, que pode ser visualizada pela redução dos valores referentes ao índice de divisão nuclear (IDN) em relação ao controle negativo.

Palavras chave: CBMN; HepG2; citotoxicidade; ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico.

INTRODUÇÃO

Dentre uma grande variedade de plantas usadas com fim medicinal, encontra-se a família Asteraceae, sendo a *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim-de-vassoura, alecrim-do-campo, vassourinha, vassoura, erva-de-são-joão-maria, um dos principais membros desta família. Esta planta é utilizada na medicina tradicional para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (CANTON e ONOFRE, 2010). Suas folhas são usadas como antipirético e tônico estomacal na medicina popular brasileira (DOS SANTOS et al., 2010).

A *B. dracunculifolia* é a fonte botânica mais importante para a obtenção de uma própolis brasileira, chamada de própolis verde, por causa de sua cor. Na própolis verde já foram identificados mais de 200 compostos químicos, entre os mais ativos podemos citar os flavonóides, ácidos aromáticos, terpenóides, aldeídos, álcoois, ácidos alifáticos e ésteres, aminoácidos, esteroides e açúcares (BARROS et al., 2009). A própolis possui diversas propriedades biológicas e terapêuticas e desde a antiguidade já era utilizada como medicamento popular no tratamento de feridas e infecções.

Apesar de apresentar uma grande variação na sua composição química, os diferentes tipos de própolis encontrados na região sudeste e sul do Brasil apresentam o composto

1 Aluno do curso de Biomedicina da ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPq – queilak@hotmail.com

2 Aluno do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde — pazadalberto19@hotmail.com

3 Professor dos cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina e do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – rafael.rodrigues@ulbra.br

polifenólico artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (RESENDE et al., 2007; MATSUDA E ALMEIDA-MURADIAN, 2008).

O artepelin c vem sendo alvo de estudos em relação às suas atividades biológicas. Estudo recente sugere que o artepelin C promove a diferenciação de adipócitos e a entrada de glicose nestas células, em parte através da ligação direta ao receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama (PPAR γ) e, desta forma, o consumo desta substância poderia reduzir o risco de diabetes tipo 2 (CHOI et al., 2011).

A ação genotóxica e antígenotóxica do artepelin c foi recentemente investigada nos testes cometa e micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) em células V79 de hamster Chinês (DE OLIVEIRA et al., 2013). Os autores verificaram que o artepelin c foi genotóxico, apresentando diferenças significativas em relação ao controle negativo, em ambos os ensaios, na maior concentração empregada (20 μ M). Por outro lado, todas as concentrações do artepelin c (2.5, 5.0 e 10.0 μ M) foram antígenotóxicas em relação às lesões induzidas pelo metil-metano-sulfonato (MMS), tanto no ensaio cometa quanto no CBMN. Os autores apontam que esta atividade protetora associada ao artepelin c está, provavelmente, ligada à sua ação antioxidante.

Diante da escassez de estudos voltados para a análise tóxico-genética do artepelin C em células humanas metabolicamente competentes, faz-se necessário o uso de metodologias que ajudem a esclarecer a toxicidade genética deste composto. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade genética do artepelin c em células de hepatoma humano (HepG2).

METODOLOGIA

Agentes químicos

O artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), CAS no. 72944-19-5, foi adquirido da Wako Chemicals USA, Inc. através do Grupo Demorellis/DMSscientific, São Paulo-SP.

Cultivo celular

As células HepG2 foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, número de catálogo 0103) . As células foram cultivadas em monocamadas em frascos de cultura de 75 cm² (TPP), contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos (combinado de estreptomicina e penicilina a 1% e gentamicina a 0,1% ambos obtidos da Gibco) a 37°C em uma incubadora (Thermo Scientific) com 5% de CO₂.

Teste de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese - CBMN

Para a realização dos experimentos, as células foram semeadas em placas de cultivo celular com 24 poços (TPP), sendo adicionadas em cada poço aproximadamente 100.000 células. Desta maneira os testes foram realizados em duplicata e em paralelo. Após 24 h de cultivo, as células foram submetidas a diferentes concentrações do artepelin C. O fim dos tratamentos ocorreu após 44 h do início da cultura, através da lavagem das células com solução salina-fosfato (PBS). Em seguida foi adicionado novo meio de cultura contendo CIT-B, por mais 28 h. O tempo total de incubação das células foi de 72h a 37°C. Após este período, as células foram tripsinizadas e coletadas em citocentrífuga (Presvac) (5min a 700 rpm), para serem fixadas em lâminas de vidro, coradas (Instant-Prov/ Newprov[®]) e desta forma prontas para a realização das análises em microscópio óptico com um aumento de 1000x.

A comparação estatística foi feita através da análise da variância (*one-way* ANOVA) com teste *post hoc* de Dunnett para uma significância estatística $\alpha=0,05$.

O parâmetro utilizado para a avaliação da cinética celular foi o Índice de Divisão Nuclear. Nesse sentido, 500 células foram analisadas por cultura e verificadas quanto à frequência de células mono, bi, tri e tetranucleadas. A partir destes dados o IDN foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{IDN} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{NT}$$

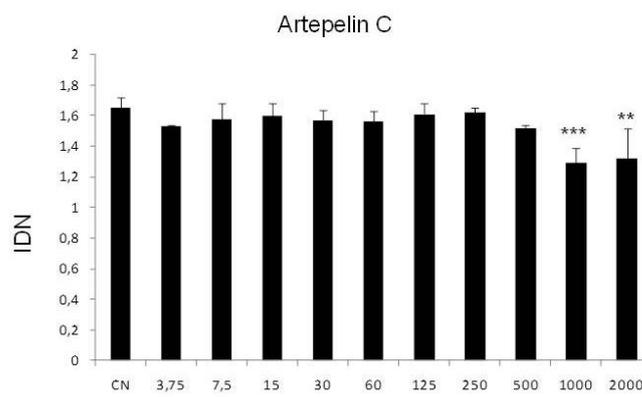
M1-M4 representam o número de células com 1-4 núcleos e NT corresponde ao número total de células analisadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas os resultados referentes ao IDN são mostrados, já que a avaliação da frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares está em fase de análise das lâminas. De fato, em relação aos parâmetros que avaliam alterações cromossômicas, o número de células analisadas até o momento, bem como a execução de apenas um experimento, não são suficientes para a realização de uma análise estatística adequada.

Dessa forma, com relação ao IDN, a exposição às diferentes concentrações do Artepelin C (3,75 – 2000 µM) demonstrou que, para as concentrações de 1000 e 2000 µM, o composto foi citotóxico quando comparado ao controle negativo (Figura 1). Portanto, foi observada uma redução significativa no IDN entre as maiores concentrações do Artepelin C e o controle negativo, indicando a ação deste composto sobre a proliferação celular. Cabe salientar que, apesar destes resultados serem preliminares, eles corroboram dados da literatura científica que apontam para a ação citotóxica do Artepelin C em altas concentrações (SZLIZKA et al., 2011; XUAN et al., 2011).

Figura 1- Efeitos da exposição das células HepG2 ao artepelin C (3,75 – 2000 µM) sobre o Índice de Divisão Nuclear (IDN).



One-way ANOVA e teste post-hoc de Dunnett. ** p < 0,01; *** p < 0,001

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se, com base nos resultados preliminares, que altas concentrações do artemelin C estão associadas com efeitos citotóxicos em células HepG2.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa PIBIC. A FAPERGS pelo auxílio financeiro por meio do edital PqG 2014.

REFERÊNCIAS

- BARROS MP, LEMOS M, MAISTRO EL, LEITE MF, SOUSA JPB, BASTOS JK, et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. **J Ethnopharmacol.**, v. 120, p.372-7, 2008.
- CANTON, MARILDE; ONOFRE, SIDENEY BECKER. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 3, jul. 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000300010&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 16 jul. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300010>.
- CARVALHO, A. A., FINGER, D., MACHADO, C. S., SCHMIDT, E. M., DA COSTA, P. M., ALVES, A. P. N. N., MORAIS, T. M. F., DE QUEIROZ, M. G. R., QUINÁIA, S. P., DA ROSA, M. R., DOS SANTOS, J. M. T., PESSOA, C., DE MORAES, M. O., COSTA-LOTUFO, L. V., SAWAYA, A. C. H. F., EBERLIN, M. N., TORRES, Y. R. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1239-1245, 2011.
- CHOI, S. S., CHA, B. Y., IIDA, K., LEE, Y. S., YONEZAWA, T., TERUYA, T., NAGAI, K., WOO, J. T. Artemillin C, as a PPAR γ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, p. 925-933, 2011.
- DE OLIVEIRA, P.F., DE SOUZA LIMA, I.M., MONTEIRO NETO, M.A.B, BASTOS, J.K., DA SILVA FILHO, A.A., TAVARES, D.C. Evaluation of Genotoxicity and Antigenotoxicity of Artemillin C in V79 Cells by the Comet and Micronucleus Assays. *Nutrition and Cancer*, dx.doi.org/10.1080/01635581.2013.815233, 2013.
- MATSUDA, A. H., DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Validated method for the quantification of artemillin-C in brazilian propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 179-183, 2008.
- RESENDE, F. A., ALVES, J. M., MUNARI, C. C., SENEDESE, J. M., SOUSA, J. P., BASTOS, J. K., TAVARES, D. C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, v. 634, p. 112-118, 2007.
- SZLISZKA, E., ZYDOWICZ, G., JANOSZKA, B., DOBOSZ, C., KOWALCZYK-ZIOMEK, G., KROL, W. Ethanollic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 38, p. 941-953, 2011.

XUAN, H., ZHAO, J., MIAO, J., LI, Y., CHU, Y., HU, F. Effect of Brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 78-85, 2010.