



AValiação DA GENOTOXICIDADE DO ARTEPELIN C EM CÉLULAS HEPG2

Dayana Soriano Spencer de Freitas¹
Francisco Adalberto do Nascimento Paz²
Ana Paula de Souza³
Mauricio Lehmann⁴
Rafael Rodrigues Dihl⁵

Resumo

O uso de plantas como terapia para vários problemas de saúde é uma prática milenar. 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. Diversos trabalhos identificaram mais de 200 compostos químicos na própolis verde, sendo que estudos fitoquímicos têm demonstrado que o Artepelin C (Art C) é um dos principais componentes bioativos desta própolis. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade do Art C em células HepG2. Os resultados demonstraram um aumento significativo de danos no DNA das células expostas a maior concentração de Art C, no tratamento de 24 h. Não foram observadas diferenças significativas no tratamento de 3 h. Os resultados deste estudo contribuem para a caracterização toxicológica do Art C.

Palavras-chave: Cometa; danos no DNA; hepatoma; art C

INTRODUÇÃO

O grande número de substâncias com atividade farmacológica extraída de plantas exige a necessidade de estabelecer o potencial terapêutico e toxicológico das mesmas, quando utilizadas pela população com fins medicinais (MENDONÇA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008). A própolis possui diversas propriedades biológicas e terapêuticas e é utilizada pela população desde a antiguidade. A principal fonte para obtenção da própolis brasileira, chamada própolis verde, é a *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim do campo ou vassourinha (CANTON e ONOFRE, 2010). Atualmente, a substância é usada com maior frequência na prevenção e tratamento de feridas e infecções da via oral, também como antimicótico e cicatrizante (BANKOVA, 2005; FUNARI, 2007).

Os diferentes tipos de própolis encontrados na região sudeste e sul do Brasil apresentam o composto polifenólico Artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico)

1 Aluna do curso de graduação em Ciências Biológicas – Bolsista PROBIT/FAPERGS (dayspencer12@gmail.com)

2 Doutorando do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

3 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

4 Professor do curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

5 Professor Orientador dos cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA (rafael.rodriques@ulbra.br)

(RESENDE et al., 2007; MATSUDA E ALMEIDA-MURADIAN, 2008). De fato, estudos fitoquímicos têm demonstrado que este composto é um dos principais componentes bioativos da própolis brasileira (SHIMIZU et al., 2004). O artepelin C vem sendo alvo de estudos em relação às suas atividades biológicas. Estudo recente sugere que este composto 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 e, desta forma, o consumo desta substância poderia reduzir o risco de diabetes tipo 2 (CHOI et al., 2011). 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, este estudo avaliou a genotoxicidade do artepelin C em células hepáticas humanas, HepG2, por meio da versão alcalina do teste cometa.

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 / DMScientific, 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.

Ensaio Cometa

O Teste Cometa (*single-cell gel assay - SCG*) baseia-se na técnica microeletroforética para a avaliação de danos no DNA de células individuais. A versão alcalina (pH>13) deste bioensaio permite a detecção dos seguintes danos genéticos: (i) quebras de fita de DNA, simples e duplas, (ii) sítios álcali-lábeis, (iii) associações DNA/DNA e DNA/proteína e (iv) reparo incompleto por excisão após quebra de fita simples (TICE et al., 2000).

Para a determinação da genotoxicidade do artepelin C, dois experimentos foram realizados em duplicata, em dias diferentes para assegurar a reprodutibilidade. Para o teste, 1X10⁵ células foram semeadas por poço em placas de 24 poços (TPP) e incubadas durante 24 horas em meio DMEM completo. Em seguida as células foram lavadas com DPBS e submetidas aos tratamentos de 3 h e 24 h com as diferentes concentrações do Art C (3,75 – 60 µM). No final dos tratamentos, as células foram lavadas com DPBS a 37°C e tripsinizadas com 650 µL de tripsina. Após 5 minutos, as células foram ressuspensas em meio completo, e o volume da suspensão celular foi imediatamente utilizado para o ensaio.

As células foram homogeneizadas com gel de agarose de baixo ponto de fusão, distribuídas sobre lâminas de vidro previamente cobertas com gel de agarose de ponto de fusão normal. Estas lâminas foram mergulhadas em solução de lise e submetidas a um campo elétrico que induz a migração de fragmentos livres de DNA para fora do núcleo. Após a eletroforese em condições alcalinas (pH>13), as lâminas foram coradas com brometo de etídio e os núcleos das células portadoras de quebras de DNA foram visualizados sob a forma de um cometa (TICE et al., 2000).

Após coloração, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51). Um total de 100 células foi analisado por amostra – 50 células contadas para cada repetição (TICE et al., 2000). Os núcleos intactos aparecem redondos, enquanto que nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, mostrando uma cauda de fragmentos, semelhante a um cometa. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cauda simples. A classificação dos cometas foi realizada por meio de um *software* (*Comet Assay IV - Perceptive*) acoplado ao microscópio. O parâmetro utilizado para a avaliação de danos foi a % de DNA na cauda (*tail intensity*). A comparação estatística foi feita através da análise da variância (*one-way ANOVA*) com teste *post hoc* de Dunnett para uma significância estatística $\alpha=0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que se refere à avaliação da atividade genotóxica, a análise dos dados, após tratamento de 3 e 24 h (Figuras 1 e 2) mostra que houve aumento significativo apenas na frequência de danos no DNA na concentração de 60 μM , no período de 24 h. Nas demais concentrações não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com Art C e o controle negativo, para ambos os tempos de exposição.

Resultados semelhantes foram descritos em outros estudos. O Art C não exerceu atividade mutagênica quando avaliado no teste de Ames em *Salmonella thyphimurium* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102, na presença e ausência de metabolização exógena (S9), em concentrações que variaram de 0,69 a 10,99 $\mu\text{g/placa}$ (RESENDE et al., 2012). Adicionalmente, quando avaliado *in vivo* em camundongos machos Swiss através dos testes de micronúcleos em células do sangue periférico e teste cometa em células do fígado, o Art C também não induziu lesões no DNA (MONTEIRO NETO et al., 2011). Neste último estudo foram utilizadas três concentrações de Art C: 0,4; 0,8 e 1,6 $\text{mg.kg}^{-1}\text{p.c.}$

Quando avaliado em células V79 (fibroblastos de hamster Chinês) através dos testes de micronúcleos e cometa, o Art C foi mutagênico e genotóxico apenas na concentração mais alta avaliada (20 μM). Nas demais concentrações, este composto não induziu danos genéticos (2,5; 5,0; 10 μM) (DE OLIVEIRA et al., 2013). Neste estudo os autores atribuíram a atividade mutagênica e genotóxica do Art C à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, sugeriram que a ausência de efeito mutagênico do Art C *in vivo* seria atribuída a uma possível biotransformação deste composto, que estaria sujeito à ação de enzimas específicas e/ou metabólitos não-específicos, que levaria à formação de metabólitos com propriedades diferentes das apresentadas pelo composto original e características hidrofílicas, o que facilitaria a sua excreção. Neste sentido, ao estudar a absorção e biodisponibilidade deste composto após a administração oral em ratos Wistar, KONISHI et al. (2005) verificaram que, comparado ao ácido *p*-cumárico, o Art C apresentou uma biodisponibilidade cerca de 278 vezes menor, além de estar mais suscetível à eliminação hepática.

SHIMIZU et al. (2004) demonstraram que o Art C foi transportado através de células de adenocarcinoma de colon intestinal humano (Caco-2) e facilmente incorporado em células de carcinoma hepático humano (HepG2) sem sofrer conjugação, tendo sido capaz de suprimir o dano oxidativo na membrana celular e no DNA. Os resultados do nosso estudo somados aos dados disponíveis na literatura científica demonstram que o Art C pode exercer ação pró-oxidante ou antioxidante, dependendo da concentração utilizada. Dessa forma, futuras investigações devem ser direcionadas para a avaliação do potencial quimioprotetor do Art C.

Figura 1: Danos no DNA após exposição (3 h) das células HepG2 às diferentes concentrações (3,75 – 60 μ M) de Artepelin C. CN- Controle Negativo (DMSO 1%). CP – Controle Positivo (B[a]P 30 μ M). *One-way* ANOVA e teste *post-hoc* de Dunnett. * $P < 0,05$.

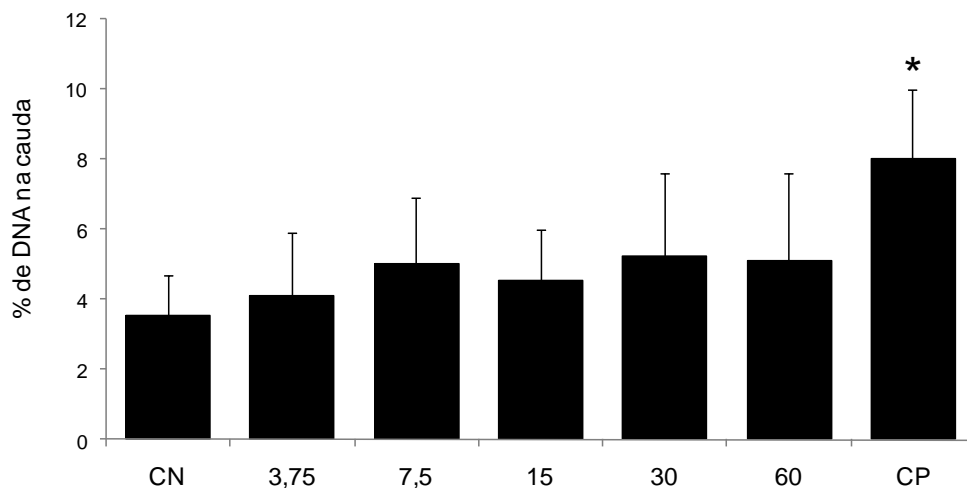
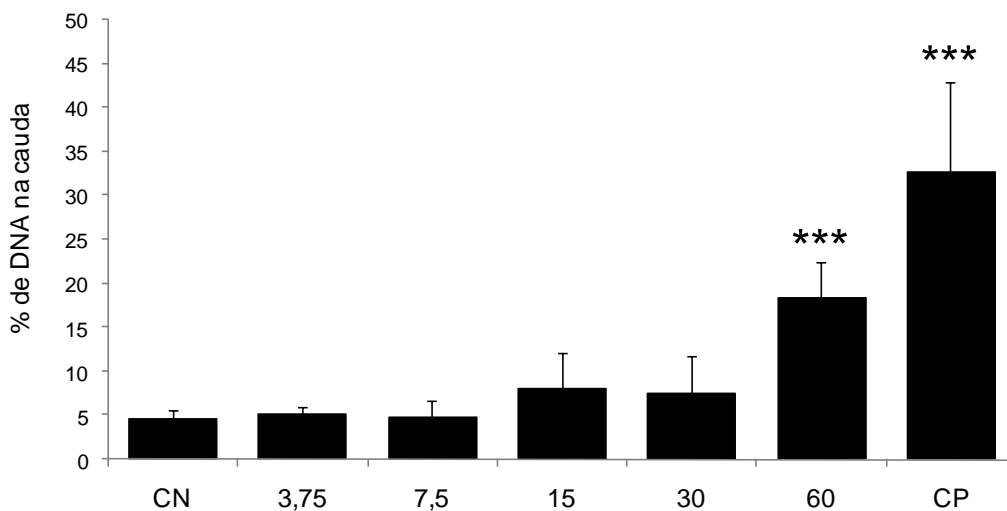


Figura 2: Danos no DNA após exposição (24 h) das células HepG2 às diferentes concentrações (3,75 - 60 μ M) de Artepelin C. CN- Controle Negativo (DMSO 1%). CP – Controle Positivo (B[a]P 30 μ M). *One-way* ANOVA e teste *post-hoc* de Dunnett. *** $P < 0,001$.



CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a concentração de 60 μ M de Art C é genotóxica às células HepG2, no ensaio cometa, no tratamento de 24 h.

AGRADECIMENTOS

Para a FAPERGS pelo auxílio financeiro por meio do edital PqG 2014 e pela concessão da bolsa PROBITI.

REFERÊNCIAS

- BANKOVA, V. S., DE CASTRO, S. L., MARUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, p. 3-15, 2000.
- 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.
- CHOI, S. S., CHA, B. Y., IIDA, K., LEE, Y. S., YONEZAWA, T., TERUYA, T., NAGAI, K., WOO, J. T. Artepillin 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 Artepillin C in V79 Cells by the Comet and Micronucleus Assays. *Nutrition and Cancer*, dx.doi.org/10.1080/01635581.2013.815233, 2013.
- FUNARI, C. S., FERRO, V. O., MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 206-212, 2007.
- KONISHI Y., HITOMI Y., YOSHIDA M., ET AL. Absorption and bioavailability of artepillin C in rats after oral administration. *J Agric Food Chem.* 2005;53: 9928-33.
- MATSUDA, A. H., DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Validated method for the quantification of artepillin-C in brazilian propolis. *Phytochemical Analysis*, v. 19, p. 179-183, 2008.
- MENDONÇA, C.J.S., ARANA, S., DIAS, P.C., BARATA, J.E., SERRA, G. E. Hepatotoxicidade do extrato bruto aquoso de *Eupatorium laevigatum*. *Revista de Tecnologia de Alimentos – UNICAMP*, 2001.
- OLIVEIRA, A.B., LONGHI, J.G., ANDRADE, C.A., MIGUEL, O.G, MIGUEL, M.D. Brazilian Phytotherapeutic Regulamentation. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, 2008.
- MONTEIRO NETO M.A.B, LIMA I.M.S., FURTADO R.A., BASTOS J.K., DA SILVA FILHO, A.A., TAVARES, D.C. In vivo assessment of genotoxic and antigenotoxic effects of artepillin C using the micronucleus and comet assays. *Journal of Applied Toxicology* 31, 714–719, 2011.
- 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.
- RESENDE, F.A., MUNARI, C.C., MONTEIRO NETO, M.A.B., TAVARES, D.C., BASTOS, J.K., SILVA FILHO, A.A., VARANDA, E.A. Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. *Molecules*, v.17, p.2335-2350, 2012.
- SHIMIZU, K., ASHIDA, H., MATSUURA, Y., KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 424, p. 181-188, 2004
- TICE R.R.; AGURELLE, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay : guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.35, p. 206-221, 2000.