



ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DO ARTEPELIN C NO TESTE DE MICRONÚCLEOS COM BLOQUEIO DA CITOCINESE (CBMN)

Jordana Ariane Nunes da Rosa¹
Ana Paula de Souza²
Mauricio Lehmann³
Rafael Rodrigues Dihl⁴

Resumo

O composto polifenólico Artepelin C (Art C - ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), é o principal componente bioativo da própolis verde. Por apresentar importantes atividades biológicas como antioxidante, indutor da apoptose e antitumoral, este composto vem sendo alvo de estudos. Avaliar a modulação de dano no DNA é extremamente importante, uma vez que, alguns compostos naturais podem atuar reduzindo ou removendo mutações espontâneas ou induzidas, essa propriedade é conhecida como antimutagenicidade. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor do Artepelin C contra instabilidade cromossomal induzida por mutágeno, utilizando o teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese CBMN. Os parâmetros avaliados foram as frequências de micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN) e brotos nucleares (BrN). A bleomicina (BLEO) causa danos oxidativos no DNA e, dessa forma, foi utilizada como agente indutor de danos. A linhagem celular glioblastoma humana (U-87MG) foi exposta a três protocolos de tratamentos: pré- tratamento, onde as concentrações 3,9; 7,8; 15,6; 31,2 e 62,5 μM de ArtC foram administradas antes da BLEO; tratamento simultâneo, Co- tratamento com diferentes concentrações do ArtC e BLEO; pós- tratamento, o ArtC foi administrado depois da BLEO. Sendo assim, os resultados preliminares sugerem que o ArtC foi capaz de reduzir a frequência de micronúcleos em comparação a células expostas a BLEO, nos três protocolos de tratamento anteriormente citados, sugerindo que o Art C pode agir protegendo o DNA contra danos ou estimulando vias de reparo.

Palavras chave: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico; CBMN; BLEO; U-87MG; antimutagenicidade.

INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas na medicina popular há séculos como alternativa no tratamento de inúmeras doenças. São utilizadas na forma de chá, compressas, xaropes, e mais recente como matéria prima no desenvolvimento de medicamentos a partir de moléculas provenientes das plantas. Existe uma estimativa de que cerca de 25% dos medicamentos

1 Aluna do curso de Ciências Biológicas da ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS – jordana.ariane@hotmail.com

2 Aluna de doutorado do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde – anapaulas23@gmail.com

3 Professor do curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA – mauriciol@ulbra.br

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

receitados mundialmente são originados de recursos naturais, o que remete a necessidade de investigar os benefícios terapêuticos que essas plantas podem apresentar e possíveis riscos à saúde humana (CANTON; ONOFRE, 2010).

A família Asteraceae representa uma importante fonte em variedade de recursos medicinais. Um dos principais membros dessa família, é a espécie *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida por alecrim-do-campo ou vassourinha, é muito utilizada na medicina tradicional no combate de distúrbios gástricos, cansaço físico, afecções febris entre outros sintomas (CANTON; ONOFRE, 2010). Também é reconhecida como a fonte botânica mais importante para obtenção da própolis brasileira, a própolis verde, em referência a sua cor (CANTON; ONOFRE, 2010; RODRIGUES et al., 2009, CAMPOS et al., 2016).

A própolis é uma substância produzida a partir de cera, pólen e resinas coletadas por abelhas, em diferentes partes da planta, e essa mistura recebe enzimas salivares das abelhas, o que confere o aspecto de resina, característico da mesma (De-MELO et al., 2014; ROBERTO, 2016). É muito utilizada na medicina popular em decorrência a suas diversas propriedades terapêuticas e biológicas, como ação antimicrobiana, imodulatória e anti-inflamatória (BURDOCK, 1998; SFORCIN, 2016). A própolis verde, extraída da *B. dracunculifolia*, é produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. Em sua composição já foram identificados mais de 200 compostos químicos, mas o principal composto bioativo que se destaca é o composto polifenólico Artepelin C -ArtC- (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), (RESENDE et al., 2007; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN,2008).

O ArtC tem sido alvo de investigações devido suas atividades biológicas, principalmente por sua importante atividade antioxidante. Diversos estudos relacionam a atividade antitumoral encontrada na utilização da própolis com a presença do Artepelin C (CHAN, 2013; SILVA et al., 2013; SZLISZKA et al., 2013). Outros trabalhos desenvolvidos, em diferentes organismos experimentais e variados bioensaios como teste de Ames, teste cometa e teste SMART, demonstram que o ArtC foi capaz de modular danos causados por diferentes tipos de mutágenos (RESENDE et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; NETO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2017).

Estudos relacionados à modulação de danos causados no DNA são de extrema relevância, uma vez que podem contribuir na área de pesquisa de prevenção de doenças, como o câncer. Alguns compostos podem atuar reduzindo ou removendo a taxa de mutações espontâneas ou induzidas no DNA, um processo que é conhecido como antimutagenicidade. Sendo assim, este estudo teve como objetivo analisar a ação moduladora do ArtC no teste de micronúcleos

(CBMN), em células de glioblastoma humano (U-87MG), em três protocolos de tratamento, contra lesões causadas pelo mutágeno bleomicina (BLEO).

METODOLOGIA

O ArtC (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), CAS no. 72944-19-5, 98% de pureza, foi adquirido da Wako Chemicals USA, Inc. através do Grupo Demorellis/DMSscientific, São Paulo-SP. A bleomicina (BLEO) foi utilizada para induzir danos cromossômicos (controle positivo) para o teste de antimutagenicidade, diluída em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) incompleto à uma concentração de 3 µg/ml. Citocalasina B, CAS no. 14930-96-2, 5 mg/mL foi adquirida da Sigma – Aldrich (São Paulo, Brasil) diluída em DMSO. A linhagem celular utilizada para realização do ensaio de antimutagenicidade, foi glioblastoma multiforme humano (U-87MG), cedida gentilmente pela Profa. Dra. Ivana Grivicich do Laboratório de Biologia do Câncer do PPGBioSaúde da ULBRA. As células foram cultivadas em monocamadas em frascos de cultura de 25 cm² (TPP), contendo meio DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino e antibióticos (combinado de estreptomicina e penicilina a 1%, obtidos da Gibco, a 37°C em uma incubadora (Thermo Scientific) com 5% de CO₂. Para avaliação da antimutagenicidade as células foram semeadas em placas de cultura, incubadas por 24 horas com meio DMEM completo para então serem submetidas aos diferentes protocolos de tratamento.

Após os tratamentos, as células foram lavadas com DPBS e tripsinizadas com 350 µL de tripsina (Gibco), neutralizadas com 650 µL de DMEM completo e transferidos 100 – 150 µL da suspensão de células para citocentrífuga de bancada (CIENITEC), sendo centrifugadas a 700 x g por 5 min. A coloração das lâminas foi realizada por panótico Instant Prov (Newprov®) e após a secagem das mesmas, a leitura foi realizada em microscopia óptica com aumento de 1000x, onde foram analisadas 1000 células binucleadas por concentração para os parâmetros de MN, PN e BR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas a frequência de MN foi reduzida nos protocolos de tratamento. No pré tratamento, as células foram expostas primeiramente ao ArtC que de fato foi capaz de proteger as células dos danos no DNA causados por BLEO nas concentrações de 3,9, 7,8 e 62,5 µM. O percentual de redução da frequência de MN foi de 58,9% para a concentração de 3,9 µM e de 53,6% para as concentrações de 7,8 e 62,5 µM. No pós-tratamento, as concentrações de 31,2 e 62,5 µM de ArtC demonstraram redução da frequência de danos causados por BLEO com um percentual de redução de 81,2% e 50,9%, respectivamente. Para

o tratamento simultâneo, o ArtC apresentou capacidade de proteger as células dos danos causados por BLEO nas concentrações de 15,6 e 31,2 μM com o percentual de redução de 48,2% e 55,3% respectivamente. De fato, o ArtC mostrou-se capaz de modular danos induzidos pela BLEO à linhagem U-87MG nos três diferentes protocolos de tratamento.

Os resultados preliminares sugerem que o ArtC apresenta a característica de modulação e essa informação esta de acordo com a literatura. Outros estudos realizados usando outros bioensaios com diferentes organismos como Teste de Ames, Teste Cometa e Teste SMART (RESENDE et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; NETO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2017). Esses autores também obtiveram resultados em que o ArtC foi capaz de modular danos causados por diferentes tipos de mutágenos, em concentrações similares às utilizadas em nosso trabalho.

Tabela 1: Frequência de danos cromossômicos após a exposição (4h) das células U-87MG aos diferentes protocolos de tratamento com ArtC e BLEO para avaliação da antigenotoxicidade

Concentrações	MN ^a	PN ^a	BrN ^a	% Redução
BLEO	73,00±12,73 ^{††}	8,00 ± 5,66	11,50± 4,95 [†]	
CN	17,00 ±1,41	2,00 ±1,41	2,50 ± 2,12	
Pré-tratamento				
3,9 μM + BLEO	40,0 ± 5,65 *	2,50 ±2,12	8,50 ± 2,12	58,9
7,8 μM + BLEO	43,0 ± 1,41 *	4,00 ±2,82	11,00± 2,12	53,6
15,6 μM + BLEO	57,5 ±10,60	2,50 ±3,53	15,50± 2,82	
31,2 μM + BLEO	57,0 ±9,89	6,00 ±2,82	17,50± 0,70	
62,5 μM + BLEO	43,0 ±12,72 *	2,00 ±1,41	10,50± 0,70	53,6
Pós-tratamento				
3,9 μM + BLEO	70,0 ± 5,65	6,00± 5,65	14,50± 0,70	
7,8 μM + BLEO	80,0 ± 8,48	9,50± 6,36	21,00± 2,82	
15,6 μM + BLEO	67,0 ± 2,82	8,00± 2,82	14,50± 9,19	
31,2 μM + BLEO	27,5 ± 9,19 **	4,00± 1,41	10,50± 6,36	81,2
62,5 μM + BLEO	44,5 ± 3,53 *	6,00 ± 1,41	10,50 ± 3,53	50,9
Tratamento Simultâneo				
3,9 μM + BLEO	62,5 ± 0,70	4,50 ± 3,53	11,50 ± 6,36	
7,8 μM + BLEO	56,0 ± 4,24	7,50 ± 4,94	14,00 ± 15,55	
15,6 μM + BLEO	46,0 ± 5,65 *	5,50 ± 0,70	3,500 ± 0,70	48,2
31,2 μM + BLEO	42,0 ± 4,24 *	3,50 ± 3,53	15,00 ± 4,24	55,3
62,5 μM + BLEO	61,0 ± 4,24	5,00 ± 4,24	11,50 ± 10,60	

CP: controle positivo - BLEO (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$); CN: controle negativo - DMSO 1%; MN: micronúcleos; BrN: brotos nucleares; PN: ponte nucleoplasmática *Significativamente diferente do CP * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Significativamente diferente do CN [†] $p < 0,05$; ^{††} $p < 0,01$. ANOVA teste *post-hoc* Dunnet. ^aMédias obtidas em 500 células binucleadas analisadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos até o momento sugerem que o ArtC apresenta atividade modulatória contra a genotoxina BLEO nos diferentes protocolos de tratamento, o que sugere

que o ArtC pode atuar protegendo o DNA contra danos ou estimulando vias de reparo. Contudo, é necessário aumentar o número amostral para confirmar os resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

- BURDOCK, G.A. Review of the Biological Properties and toxicity of bee propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.347-63, 1998.
- CAMPOS, F.R. et al. Baccharis (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. **Chemistry Biodiversity**, v. 13, p1-17, 2016.
- CANTON, M.; ONOFRE, S.B. Interferência de extratos da Baccharis dracunculifolia DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.3, p. 348-54, 2010.
- CHAN, G.C.F.; CHEUNG, K.W.; SZE, D.M. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v.44, p.262-73, 2013.
- De-MELO, A.A.M. et al. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 44, n.3, p.341-348, 2014.
- MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Validated method for the quantification of Artepillin-C in Brazilian propolis. **Phytochemical Analysis, Sussex**. v. 19, p. 179-183, 2008.
- NETO, M.A.B.M.et al. Antigenotoxicity of artepillin C in vivo avaluated by the micronucleus and comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v.31, p.714-19, 2011.
- OLIVEIRA, P.F. et al. Evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of artepillin C in V79 cells by the comet and micronucleus assays. **Nutrition and Cancer**, v.65, n.7, p.1089-103, 2013.
- RESENDE, F. A. et al. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by Baccharis dracunculifolia. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 634, p. 112-118, 2007.
- RESENDE, F.A. et al. Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of Baccharis dracunculifolia and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. **Molecules**, v. 17, p. 2335-50, 2012.
- ROBERTO, M. M. et al. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and Baccharis dracunculifolia, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology In Vitro**, v.33, p.9-15, 2016.
- RODRIGUES, C.R. et al. Mutagenic and genotoxic effects of Baccharis dracunculifolia (D.C.). **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p. 321-24, 2009.

RODRIGUES, C.R.F. et al. Assessment of genotoxic and antigenotoxic activities of artemillin C in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.101, p. 48-54, 2017.

SFORCIN, J.M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n.6, p. 984-905, 2016.

SILVA, C.C.F. et al. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, v. 36, n.2, p.237-40, 2013.

SZLISZKA, E.; ZYDOWICZ, G.; MIZGALA, E.; KROL, W. Artemillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal Of Oncology**, v.41, 818-28, 2012.