



INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO ARTEPELIN C

Christine Melgarejo Lences¹
Francisco Adalberto do Nascimento Paz²
Ana Paula de Souza³
Mauricio Lehmann⁴
Rafael Rodrigues Dihl⁵

Resumo

As plantas medicinais têm uma grande relevância para a população, pois são usadas constantemente para o tratamento de inúmeros problemas de saúde, sendo, por várias décadas, parte do cuidado tradicional em muitas comunidades. Apesar da ampla utilização das plantas medicinais, tem-se pouca informação a respeito de seus constituintes, bem como sobre os riscos em potencial oferecidos a saúde humana. 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. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação citotóxica e mutagênica do Artepelin C em uma linhagem celular derivada de fígado humano (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. Por outro lado, não foram observados aumentos significativos na indução de micronúcleos nas células expostas a concentrações não citotóxicas do Artepelin C.

Palavras-chave: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico; CBMN; HepG2; IDN; Micronúcleos

INTRODUÇÃO

A própolis possui diversas propriedades biológicas e terapêuticas e desde a antiguidade já era utilizada como medicamento popular no tratamento de feridas e infecções. A substância é usada com maior frequência na prevenção e tratamento de feridas e infecções da via oral, também como antimicótico e cicatrizante (BANKOVA et al, 2005; FUNARI et al, 2007)

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). Apesar de apresentar uma grande variação na sua composição química, os diferentes tipos de própolis encontrados na região

¹ Acadêmica do curso de graduação em Ciências Biológicas da ULBRA – Bolsista PIBITI/CNPq – christinelences@live.com

² Doutorando do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

³ Mestranda do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

⁴ Professor do curso de graduação em Engenharia Ambiental e do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

⁵ 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

sudeste e sul do Brasil apresentam o composto polifenólico Artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (RESENDE et al., 2007).

Estudos fitoquímicos têm demonstrado que o Artepelin C 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 (PPAR γ) e, desta forma, o consumo desta substância poderia reduzir o risco de diabetes tipo 2 (CHOI et al., 2011). Adicionalmente, este composto apresentou atividade indutora de apoptose (SZLISZKA et al., 2011), imunomodulatória (NAKANISHI et al., 2003), antioxidante (NAKANISHI et al., 2003), antibacteriana (SALOMÃO et al., 2008), antitumoral (DEMESTRE et al., 2009), anti-inflamatória (PAULINO et al., 2008) e antiangiogênica (MATSUNO et al., 1997).

Diante da escassez de estudos voltados para a análise tóxico-genética do Artepelin C em células humanas, 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. 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 realizada por meio da análise da variância (*one-way* ANOVA) com teste *post hoc* de Dunnett para uma significância estatística $\alpha=0,05$.

Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata, sendo analisadas 1000 células por tratamento. O critério de seleção, assim como o de contagem de células binucleadas com micronúcleos foi definido de acordo com FENECH (2007). 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:

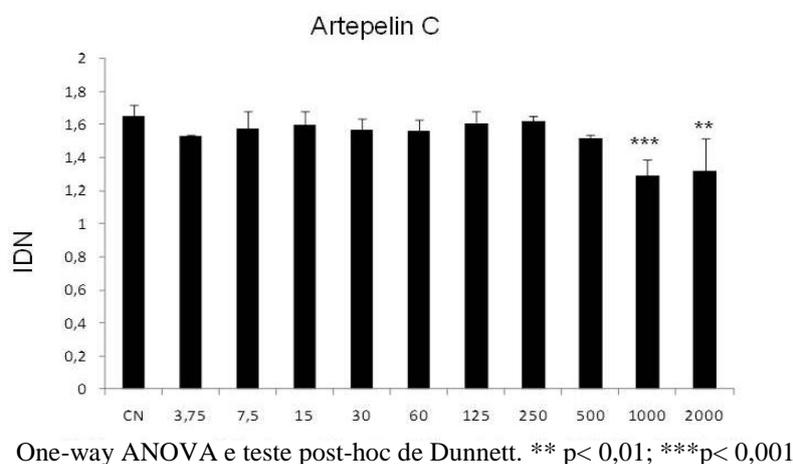
$$\text{IDN} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{NT}$$

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

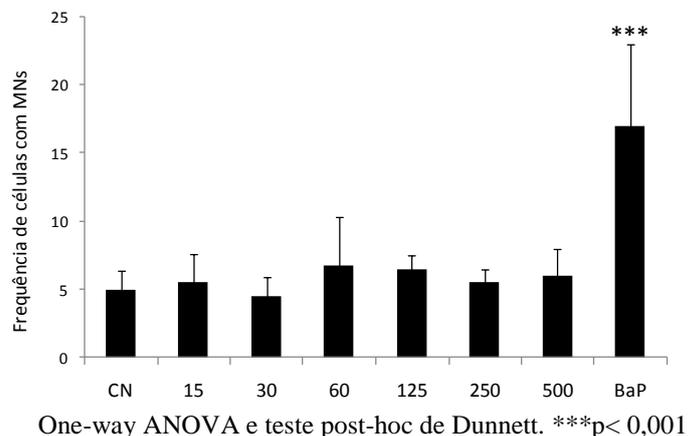
Com relação ao IDN, a exposição às diferentes concentrações do Artepelin C (3,75 – 2000 μM) demonstrou que, para as concentrações de 1000 e 2000 μM , o composto foi citotóxico quando comparado ao controle negativo (Figura 1). Portanto, foi observada uma redução significativa no IDN entre as maiores concentrações do Artepelin C e o controle negativo, indicando a ação deste composto sobre a proliferação celular. Estudos prévios publicados apontam para a ação citotóxica do Artepelin C em altas concentrações (SZLISZKA 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).



Com base nos resultados observados para o IDN, concentrações não citotóxicas do Artepelin C foram utilizadas para a avaliação da indução de micronúcleos em células HepG2. Neste sentido, não foram observados aumentos significativos nas frequências de micronúcleos das células expostas ao Artepelin C em comparação às células do controle negativo (Figura 2).

Figura 2- Frequência de MNs após exposição das células HepG2 ao Artepelin C (3,75 – 500 μM). CN= Controle Negativo. BaP= Benzopireno.



A ação genotóxica e antigenotóxica do Artepelin C foi 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 (20µM). Além disso, todas as concentrações do Artepelin C (2.5, 5.0 e 10.0 µM) foram antigenotóxicas em relação às lesões induzidas pelo metilmetano-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.

Desta forma, a ausência de mutagenicidade observada neste estudo pode estar associada ao processo de biotransformação nas células HepG2. Considerando que esta linhagem celular possui altos níveis de enzimas do citocromo P450, é possível que o Artepelin C seja encaminhado para uma via de detoxificação, não sendo capaz de induzir danos no DNA. Entretanto, um número maior de experimentos é fundamental para confirmar os resultados obtidos até o momento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se, com base nos resultados preliminares, que altas concentrações do Artepelin C estão associadas com efeitos citotóxicos em células HepG2. Somado a isso, em concentrações não citotóxicas, o Artepelin C não induz alterações cromossômicas em células HepG2.

AGRADECIMENTOS

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

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.

BARROS, M.P.; LEMOS M.; MAISTRO E.L.; LEITE M.F.; SOUSA J.P.B.; BASTOS J.K.; et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. **Journal of Ethnopharmacol**, v.120, p. 372-7, 2008.

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 I.M.L.; 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**, v. 65, Iss. 7, 2013.

DEMESTRE, M.; MESSERLI, S. M.; CELLI, N.; SHAHHOSSINI, M.; KLUWE, L.; MAUTNER, V.; MARUTA, H. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 226-230, 2009.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols** , v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

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.

MATSUNO, T.; JUNG, S. K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer Research**, v. 17, p. 3565–3568, 1997.

NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA, J.; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 1452-1454, 2003.

PAULINO, N.; ABREU, S. R.; UTO, Y., KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artemillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296-301, 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.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C. M.; CABELLO, P.H.; MARCUCCI, M.C.; DE CASTRO, S.L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**, v. 5, p. 317-324, 2008.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, p. 181-188, 2004

SZLISZKA, E.; ZYDOWICZ, G.; JANOSZKA, B.; DOBOSZ, C.; KOWALCZYK-ZIOMEK, G.; KROL, W. Ethanolic 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.