

POTENCIAL ANTITUMORAL E APOPTÓTICO DA PRÓPOLIS VERMELHA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE BEXIGA

KARINE RECH BEGNINI^{1,2*}; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON¹;
FERNANDA RODRIGUES¹; HELENA STRELOW THUROW¹; JOÃO ANTÔNIO
PÊGAS HENRIQUES³; FABIANA KÖMMLING SEIXAS^{1,2**}

¹Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

³Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS

*karibegnini@gmail.com

**seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer é mundialmente uma das principais causas de morte, sendo projetados cerca de 1.670.000 novos casos da doença nos Estados Unidos em 2013 (SIEGEL *et al*, 2013). O câncer de bexiga é o quarto tipo de tumor mais comum em homens e o décimo primeiro mais comum em mulheres, sendo responsável por aproximadamente 5% de todas as mortes ocorridas por câncer (SIMONS *et al*, 2007). Devido às altas taxas de recorrência da doença (70%) e ao tempo prolongado de tratamento, este tipo de neoplasia constitui o tratamento de maior custo dentre os diversos tipos de câncer, possuindo forte impacto econômico na saúde pública (SIEGEL *et al*, 2013). O desenvolvimento de fármacos mais eficientes e economicamente mais viáveis constitui um dos maiores desafios da terapêutica de tumores de bexiga.

Uma análise dos fármacos antineoplásicos atualmente utilizados em clínica revelou que 47,1% deles são derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007). A própolis é uma mistura de substâncias resinosas coletadas pelas abelhas a partir de plantas, sendo o Brasil detentor da maior variedade química deste composto (RIGHI *et al*, 2013). A própolis vermelha é a mais recente variedade de própolis brasileira e constitui uma fonte promissora de novos compostos bioativos como chalconas, pterocarpanos, isoflavonóides e polifenóis (TRUSHEVA *et al*, 2006). Dentre os vários tipos brasileiros, a própolis vermelha destaca-se devido às suas propriedades antineoplásicas frente a uma gama de tipos tumorais, tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo* (KAMIYA *et al*, 2012; FROZZA *et al*, 2013).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou investigar a atividade antiproliferativa e apoptótica do extrato etanólico de própolis vermelha brasileira em células humanas de câncer de bexiga.

2. METODOLOGIA

As amostras de própolis vermelha foram coletadas no nordeste brasileiro (S 10 ° 28'25" W e 36 ° 26'12") em setembro de 2011 e congeladas a -20 ° C. O extrato da própolis vermelha foi preparado a partir de 1 g de própolis bruta, ao qual foi adicionado 10 mL de EtOH-H₂O 70% (v/v). A mistura resultante foi filtrada e o solvente evaporado, obtendo-se um pó fino e vermelho. Este extrato seco foi mantido congelado (-20 ° C) e as concentrações finais do extrato (25, 50 e 100 µg/mL) foram preparadas imediatamente antes do uso, utilizando-se EtOH-H₂O 50% (v/v). A linhagem celular de carcinoma humano de bexiga (5637) foi obtida a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM da Universidade Federal

do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cultivada em estufa a 37° C, 95% de umidade e 5% de CO₂.

O efeito antineoplásico das diferentes concentrações de própolis vermelha sobre o crescimento *in vitro* da linhagem 5637, após 24 h de tratamento, foi avaliado através de técnica colorimétrica utilizando MTT (Sigma®) e de ensaio de migração celular. O ensaio de migração celular foi realizado conforme LIANG et al. (2007). Após 24 horas de tratamento com BRP, uma zona livre de células foi induzida nos poços de cultivo com o auxílio de uma ponteira para micropipeta p200. A migração das células adjacentes para essa zona livre foi acompanhada por um período de 12 horas, sendo fotografadas em tempos específicos (0, 8 e 12 h) com o auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio invertido. As imagens obtidas foram analisadas através do software Cell[^]F (Cell-F, Nova Iorque, Estados Unidos). Para o ensaio de MTT, foram realizadas coloração e leitura de densidade óptica das células tratadas, conforme indicação do fabricante. Diferenças nos valores de absorvância determinaram a porcentagem de células vivas, através de leitura de densidade óptica a 492 nm. A inibição do crescimento celular foi determinada da seguinte forma: Inibição do Crescimento = $(1 - \text{Abs}_{492\text{trated cells}} / \text{Abs}_{492\text{control cells}}) \times 100\%$.

O potencial apoptótico das diferentes concentrações de própolis vermelha foi avaliado através de citometria de fluxo, utilizando-se dois kits de detecção de apoptose: Annexin-V/7AAD (Guava Technologies, Millipore Corporation™) e TUNEL (Guava Technologies, Millipore Corporation™). Ambos os ensaios foram realizados seguindo as instruções do fabricante.

Os dados obtidos foram analisados através de one-way ANOVA, seguido por teste de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes em todas as análises, sendo exibidos nos gráficos através de letras diferentes (A, B, C). Os dados foram expressos como média \pm SEM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do efeito antiproliferativo mostrou que o extrato de própolis vermelha possui efeito inibitório de 51% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, frente à linhagem de carcinoma de bexiga, quando comparado ao controle não tratado (Fig. 1). Os resultados também demonstram níveis superiores de indução de apoptose inicial (56 e 64%) e tardia/morte (15 e 31%) nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de BRP, respectivamente (Fig. 2A). Embora ocorra um aumento da indução de apoptose tardia observada no ensaio de Anexin, esse resultado não se mostra significativo entre os tratamentos na porcentagem de células com fragmentação de DNA (apoptose tardia), após análise com TUNEL (Fig. 2B).

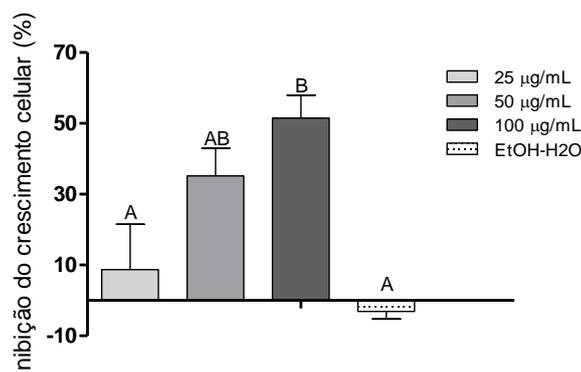


Figura 1: Extrato etanólico de própolis vermelha inibe o crescimento celular de carcinoma de bexiga, após 24 horas de tratamento.

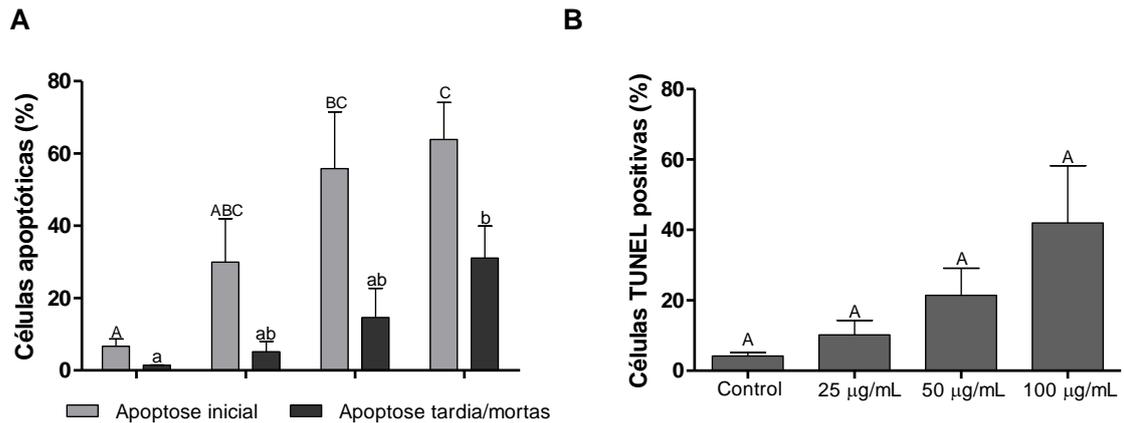


Figura 2: Extrato etanólico de própolis vermelha induz apoptose em células 5637 após 24 h de tratamento. (A) Percentual de células em apoptose inicial ou tardia/morte após análise com Annexin-V/7AAD; (B) Porcentagem de células com fragmentação de DNA (apoptose tardia) após análise com TUNEL.

O extrato etanólico de própolis vermelha também demonstrou capacidade de inibir o potencial de migração das células tumorais de bexiga, permanecendo 57 e 61% de área livre nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, respectivamente, enquanto que no grupo controle não tratado somente 33% da área permanecia livre após 12 h de acompanhamento (Fig. 3A). Além disso, o número de células com capacidade migratória após o tratamento com BRP também foi reduzido significativamente em 12 h, quando comparado com o grupo controle não tratado (Fig. 3B).

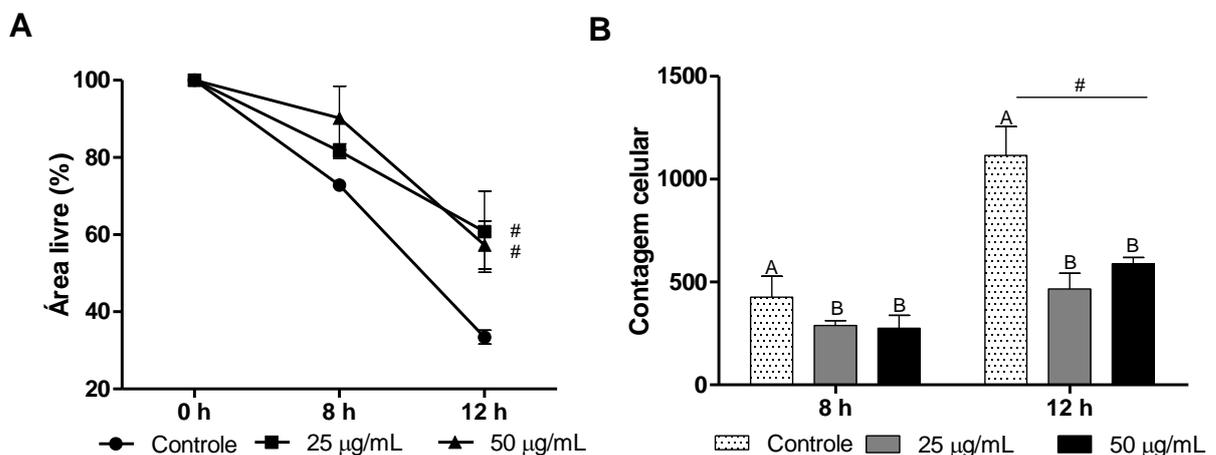


Figure 3: Diminuição da migração de células 5637 após tratamento com 25 e 50 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha. (A) Porcentagem de área livre após 0, 8 e 12 horas de tratamento. (B) Número de células que ultrapassam a linha após 8 e 12 horas de tratamento ($\#P < 0,01$)

A perspectiva de utilizar produtos naturais para tratamento do câncer vem desde a antiguidade. Atualmente, produtos de origem natural são valiosas fontes de descoberta de drogas anticâncer (PAN *et al*, 2010) e a utilização de própolis tem se mostrado eficiente no tratamento de diversos tipos de câncer, como

pâncreas, leucemia, mama, laringe e cólon cervical (CHEN *et al*, 1996; ASO *et al*, 2004; AWALE *et al*, 2008; FROZZA *et al*, 2012; KAMIYA *et al*, 2012). Nesse trabalho, investigou-se pela primeira vez o efeito do extrato etanólico da própolis vermelha brasileira sobre o potencial neoplásico de células tumorais de bexiga. Os resultados observados indicam que a própolis vermelha brasileira apresenta propriedades que podem inibir o crescimento e a migração celular tumoral, bem como propriedades que podem induzir apoptose em linhagem de carcinoma de bexiga.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que o extrato de própolis vermelha possui potencial antineoplásico, podendo ser uma alternativa futura de aplicação clínica para tratamento de câncer de bexiga. Os resultados aqui apresentados revelam ainda a necessidade de novos estudos para separação e caracterização dos componentes químicos específicos envolvidos no processo antitumoral.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aso K, Kanno S, Tadano T, Satoh S, and Ishikawa M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biol Pharm Bull** 27:727-730, 2004.
- Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, and Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorg Med Chem** 16:181-189, 2004.
- Chen JH, Shao Y, Huang MT, Chin CK, and Ho CT. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. **Cancer Lett** 108:211-214, 1996.
- Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JA, and Roesch-Ely M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem Toxicol** 52:137-142, 2013.
- Kamiya T, Nishihara H, Hara H, and Adachi T. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **J Agric Food Chem** 60:11065-11070, 2012.
- Liang CC, Park AY, and Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc** 2:329-333, 2007.
- Newman DJ and Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod** 70:461-477, 2007.
- Pan L, Chai H, and Kinghorn AD. The continuing search for antitumor agents from higher plants. **Phytochem Lett** 3:1-8, 2010.
- Righi AA, Negri G, and Salatino A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. **Evid Based Complement Alternat Med** 2013:267878, 2013.
- Siegel R, Naishadham D, and Jemal A (2013) Cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 63:11-30, 2013.
- SIMONS, M.P.; NAUSEEF, W.M.; GRIFFITH, T.S. Neutrophils and TRAIL: insights into BCG immunotherapy for bladder cancer. **Immunol.Res.**, v. 39, p. 79-93, 2007
- Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, da Rocha PF, and Tsvetkova I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat Med** 3:249-254, 2006.