

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA PRÓPOLIS VERMELHA EM NEUROBLASTOMA HUMANO UTILIZANDO O ENSAIO DE MTT**

**DANIEL D BERTOLDI<sup>1</sup>; JULIETI HUCH BUSS<sup>1</sup>; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON<sup>1,2</sup>; KARINE RECH BEGNINI<sup>1,2</sup>; JOÃO ANTONIO PÊGAS HENRIQUES<sup>3</sup>; FABIANA KOMMLING SEIXAS<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil—[ddbertoldi@hotmail.com](mailto:ddbertoldi@hotmail.com)*

<sup>2</sup>*Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil  
[seixas.fk@gmail.com](mailto:seixas.fk@gmail.com)*

<sup>3</sup>*Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil*

### **1. INTRODUÇÃO**

O neuroblastoma é um tumor do sistema nervoso simpático, sendo responsável por 15% das mortes por câncer entre crianças e adolescentes. As taxas de sobrevivência têm aumentado com o passar do tempo. Atualmente, cerca de 70% apresentam-se com metástase, sendo que a velocidade do diagnóstico é o principal fator preditor da sobrevivência (Bowman et al., 1991; Cotterill et al., 2000; Cheung et al., 2012).

A própolis vermelha brasileira (PVB), obtida na região nordeste, tem origem botânica na *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae). Existem estudos sobre os seus compostos bioativos, como fenóis simples, polifenóis, triterpenoides, isoflavonoides, entre outros, e suas atividades benéficas, como propriedades antitumorais (Daugusch et al., 2008; Piccinelli et al., 2011).

Ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico de triagem que avalia a atividade metabólica das células através do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio. É um teste amplamente utilizado na avaliação do efeito antiproliferativo de drogas tumorais, por ser baseado na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT, formando os cristais de formazan de cor azul-púrpura, que se acumulam no citoplasma celular (Plumb et al., 1989).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral do extrato alcoólico da PVB no cultivo de células tumorais de uma linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

### **2. METODOLOGIA**

A PVB foi coletada em setembro de 2011 em Brejo Grande (S 10°28'25" e W 36°26'12"). Foi protegida da luz e congelada a -20°C até que fosse realizado o procedimento de preparo.

Antes dos experimentos foi realizada a dissolução do extrato de PVB em solução alcoólica. Foi pesada a quantidade de 1g da PVB bruta seca. A amostra pesada foi misturada em 10 mL de solução de etanol 70% (v/v), e esta mistura foi

agitada à temperatura ambiente por 24 horas seguidas. Após a homogeneização, a mistura foi filtrada e colocada sobre placa de petri para evaporação, a qual produziu um pó vermelho fino, para depois ser congelado até sua utilização. O pó armazenado foi utilizado para o preparo de diferentes concentrações em solução de etanol 50% (v/v).

A alíquota estoque foi diluída em solução hidroalcoólica 50%, e mantida em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . A concentração foi calculada a partir da quantidade de 200mg diluída em 2mL de solução hidroalcoólica 50%. Para a diluição de uso foi preparado 3mL no dia dos ensaios experimentais. A solução foi diluída em meio de cultivo celular (DMEM adicionado de 10% de SFB) nas proporções de 25 $\mu\text{g}$ , 50 $\mu\text{g}$ , 100 $\mu\text{g}$  e 200 $\mu\text{g}$ . Ao adicionar ao meio de cultivo celular (DMEM suplementado com 10% SFB), a solução foi filtrada em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de cada ensaio experimental.

Foram utilizadas as concentrações de 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para realizar as avaliações da atividade antitumoral. Os ensaios de tratamento do cultivo celular foram realizados nos tempos de 24 e 48 horas. Foram utilizados dois controles experimentais, um com apenas a solução hidroalcoólica 50% e outro sendo apenas DMEM + 10% SFB.

A linhagem celular utilizada foi SH-SY5Y (neuroblastoma humano), obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil), sendo cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células cresceram em atmosfera controlada a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

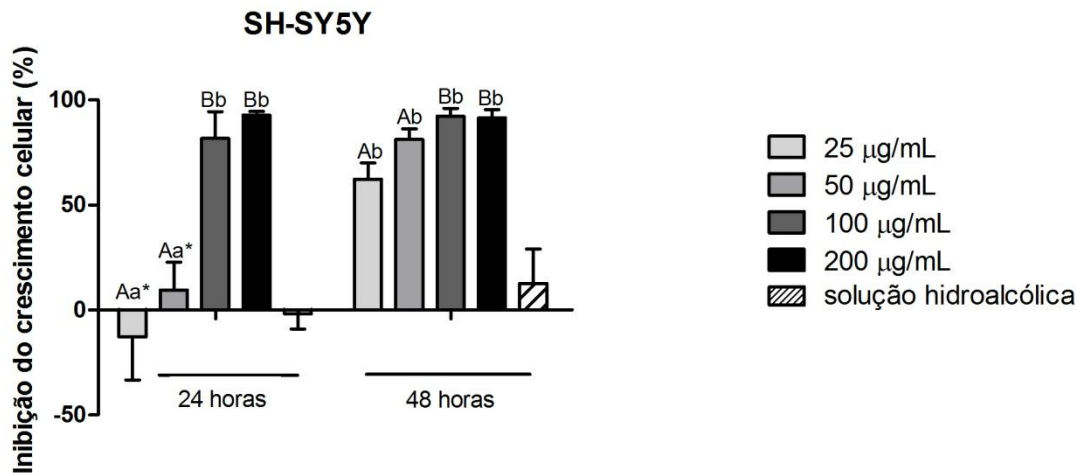
Para avaliação da atividade antitumoral, as células foram incubadas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de  $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  e mantidas em uma estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , 95% de umidade e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24h. Depois o meio de cultivo celular foi aspirado e substituído pelos meios contendo as concentrações alvo da PVB.

Para realização do ensaio MTT o meio foi removido, e em cada poço foi adicionado 20mL de MTT (5mg/mL) com 180mL de DMEM+FBS. Após 3h na estufa, os cristais de formazan foram diluídos pela adição de DMSO e a leitura da reação foi feita em 492nm em espectrofotômetro. A inibição do crescimento celular foi determinada por: inibição do crescimento é igual a absorbância de células controle multiplicado por 100%. Cada resultado foi proveniente da média das absorbâncias de 3 poços diferentes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o tratamento com as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PVB foram diferentes de 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , conforme pode ser observado na Figura 1. Os testes indicaram que maiores concentrações de PVB (100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) provocam maior inibição do crescimento celular, tanto em 24 quanto em 48 horas. Além disso, nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  também houve diferença entre os tempos de tratamento, sendo que em 48 horas foram observadas as maiores inibições. Não foi observado toxicidade do veículo, uma

vez que no controle (somente solução hidroalcoólica) não houve inibição significativa do crescimento em ambos os tempos (Figura 1).



**Figura 1:** Resultados obtidos de inibição do crescimento celular com o tratamento da própolis vermelha brasileira (PVB) em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200µg/mL) e nos tempos de incubação de 24 e 48 horas na linhagem celular humana de neuroblastoma (SH-SY5Y). As barras indicam o percentual de inibição do crescimento celular com seu desvio padrão. Letras maiúsculas indicam diferença entre concentrações; letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de tratamentos.

#### 4. CONCLUSÕES

A PVB demonstrou ser um potencial tratamento antitumoral, uma vez que apresentou um efeito de inibição do crescimento celular de neuroblastoma (SH-SY5Y) em teste *in vitro*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOWMAN, L.C.; HANCOCK, M.L.; SANTANA, V.M.; HAYES, F.A.; KUN, L.; PARHAM, D.M. et al. Impact of intensified therapy on clinical outcome in infants and children with neuroblastoma: the St Jude Children's Research Hospital experience, 1962 to 1988. **J Clin Oncol**, v.9, n.9, p.1599-608, 1991.

CHEUNG, N.K.; ZHANG, J.; LU, C.; PARKER, M.; BAHRAMI, A.; TICKOO, S.K. et al. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. **JAMA**, v.307, n.10, p.1062-71, 2012.

COTTERILL, S.J.; PEARSON, A.D.; PRITCHARD, J.; FOOT, A.B.; ROALD, B.; KOHLER, J.A. et al. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. **Eur J Cancer**, v.36, n.7, p.901-8, 2000.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.5, n.4, p.435-41, 2008.

PICCINELLI, A.L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Agric Food Chem**, v.59, n.12, p.6484-91, 2011.

PLUMB, J.A.; MILROY, R.; KAYE, S.B. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. **Cancer Res**, v. 49, n.16, p.4435-40, 1989.