

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHO BRASILEIRO NO POTENCIAL DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS DE BEXIGA

FERNANDA MARTINS RODRIGUES²; KARINE BEGNINI^{1,2}; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON²; JOÃO ANTONIO PÊGAS HENRIQUES³; FABIANA SEIXAS^{1,2}; TIAGO COLLARES^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

²Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

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

mrodrigues.fernanda@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer consiste em uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo um problema de saúde mundial. Segundo GARCIA et al (2007), é prevista a ocorrência de cerca de 27 milhões de novos casos de câncer e 17,5 milhões de mortes por câncer no mundo até o ano de 2050. Dentre os diversos tipos da doença, o câncer de bexiga representa cerca de 3% dos carcinomas que afetam a população brasileira masculina, ocupando o segundo lugar em incidência entre os tumores que afetam o sistema urológico (INCA, 2012).

Um dos maiores desafios clínicos consiste no desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos que tenham impacto significativo nas taxas de cura do câncer. Recentemente, os produtos naturais, como o própolis, vem sendo considerados uma fonte potencial e ilimitada para o desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN E CRAGG, 2007; PAN et al, 2010).

O própolis consiste em uma mistura resinosa de substâncias coletadas pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir de diversas plantas, sendo o Brasil detentor da maior variedade de tipos deste composto (RIGHI et al, 2013). O própolis vermelho é o tipo mais recentemente identificado e, desde sua descoberta, tem sido amplamente estudado devido a suas propriedades antitumorais contra uma ampla variedade de tipos de câncer, tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo* (DORNELAS et al. 2012; KAMIYA et al, 2012; FROZZA et al, 2013). Alguns de seus mecanismos de ação já elucidados incluem: supressão da proliferação de células tumorais via efeitos imunomodulatórios; bloqueio de vias de sinalização específicas de oncogenes; modulação do microambiente tumoral; além de agir como tratamento adjunto ou complementar a terapias anticâncer tradicionais (CHAN et al, 2013).

Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do própolis vermelho brasileiro no potencial de migração de células tumorais de bexiga quando cultivadas *in vitro* através de um ensaio de cicatrização (*Wound Healing Assay* ou *Scratch Assay*).

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação do extrato de própolis vermelho

Para a preparação do extrato, 1g (peso seco) de própolis vermelho foi adicionado a 10mL de EtOH-H₂O 70% (v/v) e agitado a temperatura ambiente durante o período de 24h. Após a extração, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado, obtendo-se um pó fino e vermelho. Este extrato seco foi mantido

congelado a temperatura de -20°C . As concentrações finais do extrato (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas imediatamente antes do uso utilizando EtOH-H₂O 50% (v/v).

2.2. Ensaio de cicatrização (*Wound Healing Assay* ou *Scratch Assay*)

O potencial de migração das células foi testado através de um ensaio de cicatrização *in vitro* (*Wound Healing Assay* ou *In vitro Scratch Assay*), o qual trata-se de um método fácil e barato amplamente utilizado em estudos de oncologia para a avaliação do potencial de migração celular *in vitro*. Este teste baseia-se na observação de que a criação de um espaço artificial em uma cultura celular em monocamada confluenta irá promover a migração das células presentes na borda deste espaço em direção ao mesmo, a fim de fechá-lo. O método envolve, então, a abertura de uma zona livre de células em um cultivo celular em monocamada e o acompanhamento da migração celular – através da captura de fotos em intervalos de tempo regulares – até que as mesmas cubram a zona livre que foi criada (LIANG et al, 2007).

Este método, recentemente implantado nos estudos realizados no Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular da UFPel, apresenta uma série de vantagens, uma vez que mimetiza a migração celular da forma como essa ocorre *in vivo*, principalmente para populações de células, como no caso dos tumores. Além disso, permite o estudo da regulação da migração celular por interações célula-célula e célula-matriz extracelular, muito importantes para o entendimento do processo de proliferação celular descontrolada que ocorre durante a tumorigênese (LIANG et al, 2007).

A linhagem de células de carcinoma de bexiga humana (5637) – obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) – foi cultivada em monocamada, em uma placa de 6 poços, na concentração de 5×10^6 células/mL utilizando meio de cultura apropriado (Dulbecco's Modified Eagle's Medim – DMEM) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, Estados Unidos), 1% L-glutamina e 1% penicilina/estreptomicina. As células foram cultivadas em estufa a temperatura de 37°C , 95% umidade e 5% CO₂.

Após atingirem grau desejável de confluência, as células foram submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis vermelho (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) durante o período de 24 horas. Após este período, foi aberta em cada poço uma zona livre de células, com o auxílio de uma ponteira para micropipeta p200, conforme descrito por LIANG et al (2007).

As células foram então acompanhadas durante o período de 12 horas, tendo sido fotografadas em tempos específicos com o auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio de inversão (DP 12; BX 51; Olympus, Tóquio, Japão). As imagens obtidas foram analisadas através do software Cell[®]F (Cell-F, Nova Iorque, Estados Unidos).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos naturais são considerados uma fonte ilimitada para a descoberta de drogas antitumorais (PAN et al. 2010). O uso dos mesmos para o desenvolvimento de um tratamento eficaz e específico para o câncer tem sido bastante visado, sendo o própolis e seus compostos uma alternativa promissora devido a seu potencial antitumoral (CHAN ET AL 2013; SAWICKA ET AL 2012).

O presente estudo avaliou pela primeira vez o efeito do extrato etanólico de própolis vermelho brasileiro sobre o potencial de migração de células tumorais de

bexiga. O potencial de migração da linhagem 5637 foi inibido de forma significativa após 24 horas de tratamento com o própolis vermelho. A migração celular foi controlada em função do tempo, observando-se uma inibição da largura da área livre de células em 15% e 70% após 8h e 12h, respectivamente, para ambas as concentrações de própolis vermelho testadas (Figura 1). Além disso, o número de células presentes na área livre, tanto em 8h quanto em 12h de experimento, para ambas as concentrações da droga, foram menores quando comparado aos controles não tratados, demonstrando que o própolis vermelho foi capaz de inibir o potencial de migração das células tumorais de bexiga (Figura 2).

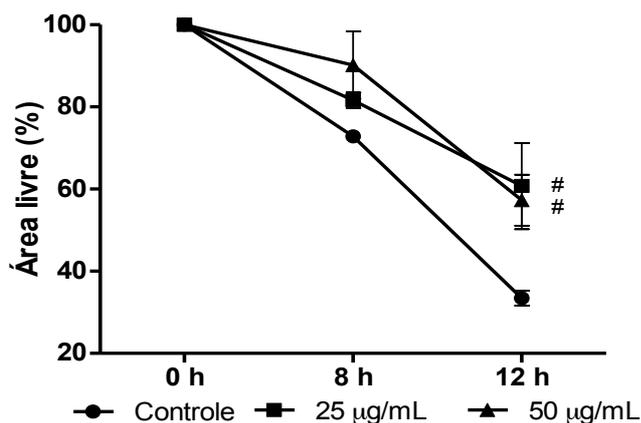


Figura 1: Diminuição da área livre de células durante o período de 12 horas para as concentrações de 25 e 50 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelho brasileiro (# $P < 0,01$).

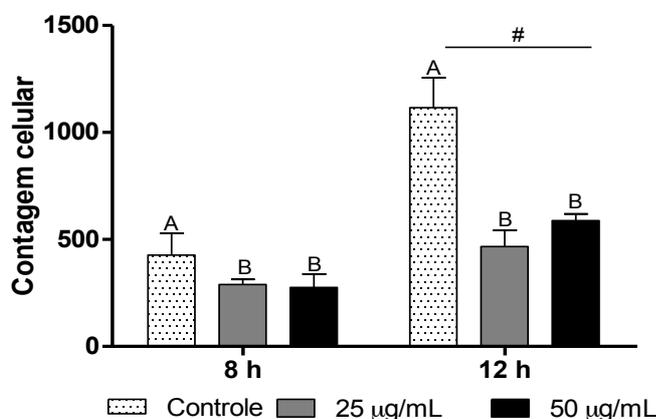


Figura 2: Número de células presentes na área livre durante os períodos de 8h e 12h para as concentrações de 25 e 50 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelho brasileiro (# $P < 0,01$).

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o própolis vermelho brasileiro apresenta um potencial antitumoral promissor contra células tumorais de bexiga, inibindo o potencial de migração e capacidade proliferativa das mesmas de forma significativa, mesmo em baixas concentrações. Assim, o própolis vermelho brasileiro representa uma fonte potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento do câncer de bexiga.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAN, GC; CHEUNG, KW; SZE, DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clin Rev Allergy Immunol** v.44, p.262-273, 2013.

DORNELAS, CA; FECHINE-JAMACARU, FV; ALBUQUERQUE, IL; MAGALHAES, HI; DIAS, TA; FARIA, MH; AL MK; RABENHORST, SH; DE ALMEIDA, PR; LEMOS, TL; CASTRO, JD; MORAES, ME; MORAES, MO. Angiogenesis inhibition by green propolis and the angiogenic effect of L-lysine on bladder cancer in rats. **Acta Cir Bras**, v.27, p.529-536, 2012.

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; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem Toxicol** v.52, p.137-142, 2013.

GARCIA, M.; JEMAL, A.; WARD, EM.; CENTER MM; HAO, Y., SIEGEL, RL., THUN, MJ. Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA, **American Cancer Society**, 2007.

INCA, Instituto Nacional do Câncer 2012. Acessado em 5 out. 2013. Online. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>.

KAMIYA, T; NISHIHARA, H; HARA, H; 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** v.60, p.11065-11070, 2012.

LIANG, CC; PARK, AY; GUAN, JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, v.2, p.329-333, 2007.

NEWMAN, DJ. e CRAGG, GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v.70, p.461-477, 2007.

PAN, L.; CHAI, H; KINGHOM, AD. The continuing search for antitumor agents from higher plants. **Phytochem Lett**, v.3, p.1-8, 2010.

RIGHI, AA; NEGRI, G; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2013, 2013.

SAWICKA, D; CAR, H; BORAWSKA, MH; NIKLINSKI, J. The anticancer activity of propolis. **Folia Histochem Cytobiol** v.50, p.25-37, 2012.