

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA EM ADENOCARCINOMA DE COLORRETAL (HT-29)

JULIETI HUCH BUSS¹; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON^{1,2}, KARINE RECH
BEGNINI^{1,2}, JOÃO ANTONIO PÊGAS HENRIQUES³, TIAGO COLLARES^{1,2},
FABIANA KOMMLING SEIXAS^{1,2}

¹Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Biotecnologia/Centro de
Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil–
julietibuss@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento
Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil–
seixas.fk@gmail.com

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

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 essas doenças, o câncer de colorretal, caracterizado pela presença de pólipos, abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto, apresentando estimativa de 32.600 novos casos, sendo 15.070 homens e 17.530 mulheres (INCA, 2014).

A própolis vêm sendo considerado uma fonte potencial e ilimitada para o desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN; CRAGG, 2007 e PAN et al. 2010). A própolis é uma mistura resinosa, coletada pelas abelhas (*Apis mellifera* L.) a partir de diversas plantas (RIGHI et al. 2013). A própolis vermelha brasileira, obtido no nordeste, é o tipo mais recentemente identificado e, desde sua descoberta, tem sido amplamente estudada devido a suas propriedades antitumorais apresentadas tanto em testes *in vitro* (DORNELAS, et al. 2012) quanto *in vivo* (KAMIYA et al. 2012 e FROZZA et al. 2013).

Visando a importância do desenvolvimento de novos fármacos que tenham impacto significativo nas taxas de cura do câncer, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico do extrato etanólico da Própolis Vermelha Brasileira (PVB) em adenocarcinoma colorretal humano (linhagem HT-29), avaliando o grau de apoptose dessas células frente ao potencial composto testado.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação do extrato da própolis vermelha

As amostras de própolis vermelha foram coletadas no nordeste brasileiro (S10 ° 28'25" W e 36 ° 26'12") em setembro de 2011 e congeladas a -20 ° C. O extrato foi preparado segundo metodologia empregada por Frozza et al. (2013). O extrato seco foi mantido congelado a -20°C. As concentrações finais do extrato (25, 50, 100 e 200 µg/mL) foram preparadas imediatamente antes do uso utilizando EtOH-H₂O 50% (v/v).

2.2. Cultivo Celular

As células de adenocarcinoma colorretal humano (linhagem HT-29) e fibroblastos de ovário de hamster (linhagem CHO - utilizada como controle não tumoral), obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil), foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células cresceram em atmosfera controlada a 37°C e 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

2.3 Determinação da citotoxicidade

O ensaio colorimétrico de MTT é um teste de triagem ao qual avalia a atividade metabólica das células através do reagente brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio. Assim, células viáveis reduzem metabolicamente o sal de MTT, formando os cristais de formazan de cor azul-púrpura, que se acumulam no citoplasma celular.

Para o ensaio de MTT, foram realizadas coloração e leitura de densidade óptica das células tratadas, conforme indicação do fabricante. Diferenças nos valores de absorbância determinaram a porcentagem de células vivas, através de leitura a 492nm. A inibição do crescimento celular foi determinada do seguinte modo: 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.

2.4 Ensaios de Apoptose Celular

O potencial apoptótico das diferentes concentrações de PVB 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.

2.5 Análise dos dados

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. Os dados foram expressos como média \pm SEM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do efeito antiproliferativo mostrou que a PVB diminuiu significativamente a viabilidade celular *in vitro* de forma de dose-tempo-dependente em HT-29, onde a inibição do crescimento celular foi superior a 50% a partir de 50 μ g/mL em 24 e 48 horas. Em relação à solução hidroalcoólica não foi observada citotoxicidade. O gráfico abaixo (Fig.1) representa os resultados obtidos de inibição do crescimento celular com o tratamento da PVB nas diferentes concentrações e nos tempos de incubação.

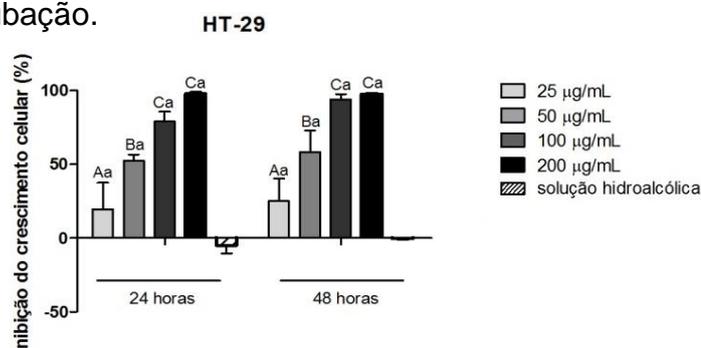


Figura 1: Taxa de inibição de crescimento celular nas linhagens HT-29 nas concentrações de 25 à 200µg/mL nos tempos de 24 e 48 horas. Letras maiúsculas representam diferenças entre as concentrações; e letras minúsculas representam diferenças entre os tempos de tratamento.

Através das análises por citometria de fluxo, podemos observar que o aumento no número de células positivas para o ensaio de TUNEL foi dose-dependente, salientado que esse resultado chegou a aproximadamente 100% de células positivas (Fig. 2A), indicando apoptose celular nas células tratadas.

No teste Annexin-V/7AAD, podemos observar que o número de células apoptóticas iniciais e tardias tiveram efeito dose-dependente nas concentrações de 25µg/mL e 50µg/mL, com aproximadamente 15% e 40% de células apoptóticas respectivamente. Enquanto que, nas concentrações de 100µg/mL e 200µg/mL o número de células apoptóticas foi de aproximadamente 100%. Nas células tratadas com a maior concentração (200µg/mL) foi observado 100% de apoptose tardia (Fig. 2B)

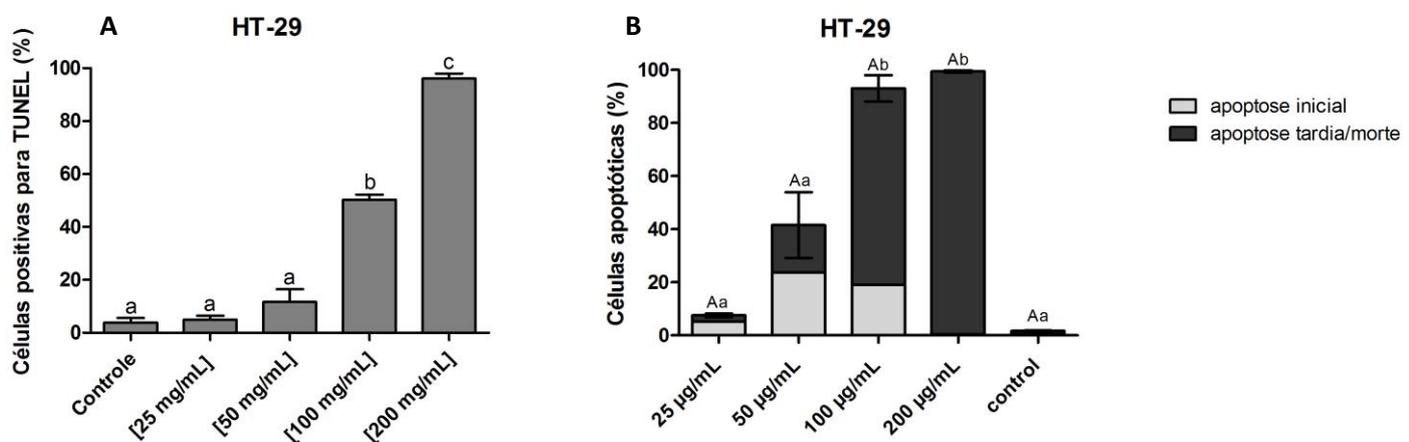


Figura 2: Análises por citometria de fluxo com o extrato etanólico da própolis vermelha brasileira. (A) Taxa de apoptose inicial e tardia/morte em relação ao percentual de células vivas na linhagem HT-29 nas concentrações de 50 à 200µg/mL no tratamento durante 24 horas. (B) Taxa de células positivas para análise de túnel na linhagem HT-29 nas concentrações de 50 à 200µg/mL durante o tratamento de 24 horas.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que a própolis vermelha brasileira apresentou efeito antitumoral inibindo o crescimento celular e induzindo a apoptose em células de câncer de colorretal (HT-29), podendo ser uma alternativa futura de aplicação clínica para tratamento de câncer de colorretal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FROZZA, CO.; GARCIA, C.S.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M.D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology** 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 15 jul. 2014. 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. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry** v.60, p.11065-11070, 2012.

NEWMAN, DJ.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Jornal of Natural Products**, v.70, p.461-477, 2007.

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