

ATIVIDADE ANTITUMORAL DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE BEXIGA

LIZIANE PEREIRA DA SILVA¹; KARINE RECH BEGNINI²; JULIETI HUCH BUSS³; NATHÁLIA VIERIA SEGATTO³, JOÃO ANTONIO PÊGAS HENRIQUES⁴, FABIANA KOMMLING SEIXAS⁵

¹ Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGB), Centro de desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – lizianepsilva@gmail.com

² Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGB), Centro de desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – karinebegnini@gmail.com

³ Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Graduação em Biotecnologia, Centro de desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – julietibuss@hotmail.com; naty_segatto@hotmail.com

⁴ Universidade de Caxias do Sul, RS, Brasil- pegas.henriques@gmail.com

⁵ Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGB), Centro de desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga é o nono tipo mais freqüente de câncer no mundo. Em 2012, mais de 400 000 casos de câncer de bexiga ocorreram em todo o mundo (GOOSSENS et al., 2015). Este tipo de tumor possui custo elevado por paciente, devido a sua alta taxa de recorrência e necessidade de monitoramento contínuo (SIEVERT et al., 2009).

Os produtos naturais têm sido investigados como tratamento de vários tipos de tumores. A própolis é um produto natural produzido pelas abelhas a partir da goma vegetal, que geralmente contém uma variedade de compostos químicos, como os ácidos fenólicos, ésteres, flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonois, dihydroflavonols e chalconas) terpenos, aldeídos aromáticos, ácidos, estilbenos e β -esteroidal (GARDANA et al., 2007).

A própolis vermelha brasileira mostrou-se eficaz no tratamento de linhagens de células tumorais (AWALE et al., 2008; KAMIYA et al., 2012; PINHEIRO et al., 2014). É uma variedade obtida no nordeste do Brasil, com origem botânica *Dalbergia ecastophyllum* (Leguminosae), que confere a cor vermelha (DAUGSCH et al., 2008). Em um estudo de estrutura e atividade da própolis brasileira, foi avaliado a atividade citotóxica *in vitro* de 39 flavonoides contra seis linhagens celulares de câncer diferentes, mostrando o potencial antitumoral de flavonoides presentes neste produto natural (LI et al., 2008). Já é conhecida a atividade antitumoral de alguns flavonoides, onde têm sido proposto mecanismos moleculares, tais como (SINGH et al., 2006; MANSOOR et al., 2011; JIN et al., 2014): downregulation da proteína p53 mutante, parade de ciclo celular, inibição de tirosina quinase, inibição de proteínas heat shock, capacidade de ligação a receptores de estrogênio e inibição da expressão das proteínas Ras (KUMAR; PANDEY, 2013).

Em estudo do nosso grupo, o extrato hidralcoólico da própolis vermelha brasileira foi capaz de induzir a morte celular por apoptose e promover a diminuição do potencial de migração de linhagem de células de câncer de bexiga (BEGNINI et al., 2014). Considerando as evidências científicas acima relatadas e a necessidade de encontrar tratamentos eficazes para o câncer de bexiga, que tem alta prevalência e gera alto custo por paciente, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de frações da própolis vermelha brasileira em células humanas de câncer de bexiga.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultura celular

Células de carcinoma de bexiga, linhagem 5637, foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medim – DMEM 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. Os experimentos foram realizados em triplicatas com células em fase logarítmica de crescimento.

2.2 Ensaio citotóxico

A citotoxicidade das frações da própolis vermelha brasileira foi determinada por medição da redução de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] em cristais de formazan nas células de câncer de bexiga, linhagem 5637. As células foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células por poço e incubação por 24h. Após, foram tratadas com seis concentrações (1-100 µg/mL) de cada uma das frações por 24 e 48h. Após o tempo de incubação, o meio de cultura foi removido e 100 mL de sulfóxido de dimetil foi adicionado a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A viabilidade celular foi avaliada através da medição da absorbância, utilizando um leitor de microplacas. Após o este ensaio, uma concentração e tempo foram selecionados para posterior análise de apoptose.

2.3 Análise de apoptose

Foi realizada a coloração DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), que emite fluorescência azul através da ligação a regiões AT do DNA. As células foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células por poço, e incubação por 24h. Após, foram tratadas com 12,5 µg/ml das três frações selecionadas, durante 48h. O ensaio foi analisado com um microscópio de fluorescência Olympus IX71 (Olympus Optical Co., Tóquio, Japão) por imagem multicor. As imagens gravadas foram analisadas usando software de Cell[^]F (Cell-F, Nova Iorque, EUA).

2.4 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 nas análises, sendo exibidos nos gráficos através de letras diferentes. Os dados foram expressos como média \pm SD.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A própolis vermelha brasileira tem sido estudada devido à sua grande quantidade de compostos com propriedades antimicrobianos, antivirais, antioxidantes e anticancerígenos (SFORCIN, 2007; AHN et al., 2009). A sua composição varia de acordo com a região e período de coleta, portanto, alguns estudos têm sugerido a caracterização da própolis vermelha brasileira (AWALE et al., 2008; LI et al., 2008; DAUGSCH et al., 2008; RIGHI et al., 2011), a fim de esclarecer quais compostos têm ação promissora como drogas futuras. Neste estudo, foi realizado o fracionamento por cromatografia, de uma amostra de própolis coletada no estado de Alagoas, Brasil, seguido de caracterização das

frações biologicamente ativas frente a linhagem 5637 de câncer de bexiga. A caracterização das frações 2F04, 2F05 e 2F08 apresentou uma constituição formada basicamente por flavonoides, uma classe de polifenóis. Compostos polifenólicos constituem um grupo diversificado de metabolitos secundários presentes na dieta humana. Estas moléculas são consideradas agentes quimiopreventivas capazes de modular vias de sinalização celular, ativar sinais de morte celular e induzir apoptose em células neoplásicas ou pré-neoplásicas, inibir a progressão ou até mesmo o desenvolvimento do câncer (FRESCO et al., 2006).

O ensaio MTT foi utilizado para determinar a citotoxicidade das frações da própolis vermelha brasileira, obtidas na separação cromatográfica contra a linhagem de câncer de bexiga. As três frações mostraram uma inibição do crescimento superior a 50% na concentração de 12,5 ug/ml.

O tratamento das células com os compostos estudados induziu alterações morfológicas típicas do processo de apoptose, incluindo a redução do volume celular e fragmentação do DNA (HU; KAVANAGH, 2003). A coloração DAPI demonstrou células com núcleos reduzidos e condensados, processo típico de apoptose. A indução de apoptose por flavonoides já é descrito em diferentes tipos de células cancerosas, como no câncer de mama (CHEN et al., 2013), de próstata (LIU et al., 2014), neuronal (GAO et al., 2008) e de leucemia mielóide (TRIVEDI; MAURYA; MISHRA, 2014).

4. CONCLUSÕES

As frações de própolis vermelha brasileira possuem atividade citotóxica e induzem a morte por apoptose em células de câncer de bexiga devido a ação dos polifenóis. Um passo seguinte será avaliar a atividade dos compostos isolados para elucidar a molécula mais eficiente contra este tipo de tumor e avaliar possível sinergismo entre os compostos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, M. R.; KUNIMASA, K.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; OHTA, T. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.53, p.643-651, 2009.
- AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; 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.**, v.16, p.181-189, 2008.
- BEGINI, K. R.; MOURA DE LEON, P. M.; THUROW, H.; SCHULTZE, E.; CAMPOS, V. F.; MARTINS, R. F.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; SAVEGNAGO, L.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; COLLARES, T.; PEGAS HENRIQUES, J. A.; SEIXAS, F. K. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evid. Based. Complement Alternat. Med.**, v.2014, p.639856, 2014.
- CHEN, J.; ZHAO, X.; YE, Y.; WANG, Y.; TIAN, J. Estrogen receptor beta-mediated proliferative inhibition and apoptosis in human breast cancer by calycosin and formononetin. **Cell Physiol Biochem.**, v.32, p.1790-1797, 2013.
- 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, p.435-441, 2008.
- FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C.; MARQUES, M. P. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. **Med. Res. Rev.**, v.26, p.747-766, 2006.

- GAO, M.; ZHANG, W. C.; LIU, Q. S.; HU, J. J.; LIU, G. T.; DU, G. H. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio. **Eur. J. Pharmacol.**, v.591, p.73-79, 2008.
- GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; PIETTA, P.; SIMONETTI, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.45, p.390-399, 2007.
- GOOSSENS, M. E.; ZEEGERS, M. P.; BAZELIER, M. T.; DE BRUIN, M. L.; BUNTINX, F.; DE, V. F. Risk of bladder cancer in patients with diabetes: a retrospective cohort study. **BMJ Open.**, v.5, p.e007470, 2015.
- HU, W.; KAVANAGH, J. J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **Lancet Oncol.**, v.4, p.721-729, 2003.
- JIN, Y. M.; XU, T. M.; ZHAO, Y. H.; WANG, Y. C.; CUI, M. H. In vitro and in vivo anti-cancer activity of formononetin on human cervical cancer cell line HeLa. **Tumour. Biol.**, v.35, p.2279-2284, 2014.
- 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.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorldJournal.**, v.2013, p.162750, 2013.
- LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorg. Med. Chem.**, v.16, p.5434-5440, 2008.
- LIU, X. J.; LI, Y. Q.; CHEN, Q. Y.; XIAO, S. J.; ZENG, S. E. Up-regulating of RASD1 and apoptosis of DU-145 human prostate cancer cells induced by formononetin in vitro. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v.15, p.2835-2839, 2014.
- MANSOOR, T. A.; RAMALHO, R. M.; LUO, X.; RAMALHETE, C.; RODRIGUES, C. M.; FERREIRA, M. J. Isoflavones as apoptosis inducers in human hepatoma HuH-7 cells. **Phytother. Res.**, v.25, p.1819-1824, 2011.
- PINHEIRO, K. S.; RIBEIRO, D. R.; ALVES, A. V.; PEREIRA-FILHO, R. N.; OLIVEIRA, C. R.; LIMA, S. O.; REIS, F. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. Modulatory activity of Brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. **Acta Cir. Bras.**, v.29, p.111-117, 2014.
- RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **J. Sci. Food Agric.**, v.91, p.2363-2370, 2011.
- SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **J. Ethnopharmacol.**, v.113, p.1-14, 2007.
- SIEVERT, K. D.; AMEND, B.; NAGELE, U.; SCHILLING, D.; BEDKE, J.; HORSTMANN, M.; HENNENLOTTER, J.; KRUCK, S.; STENZL, A. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? **World J. Urol.**, v.27, p.295-300, 2009.
- SINGH, A. V.; FRANKE, A. A.; BLACKBURN, G. L.; ZHOU, J. R. Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis. **Cancer Res.**, v.66, p.1851-1858, 2006.
- TRIVEDI, R.; MAURYA, R.; MISHRA, D. P. Medicarpin, a legume phytoalexin sensitizes myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis through the induction of DR5 and activation of the ROS-JNK-CHOP pathway. **Cell Death. Dis.**, v.5, p.e1465, 2014.