

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA EM ADENOCARCINOMA DE COLORRETAL UTILIZANDO O ENSAIO DE LIVE/DEAD

NATÁLIA VIEIRA SEGATTO<sup>1</sup>; RAQUEL ROMAN FAEDO<sup>1</sup>; JULIETI HUCH BUSS<sup>1</sup>; KARINE RECH BEGNINI<sup>1,2</sup>; JOÃO ANTONIO PEGAS 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—[naty\\_segatto@hotmail.com](mailto:naty_segatto@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, RS, Brasil.

### 1. INTRODUÇÃO

O câncer é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda principal em países em desenvolvimento, apresentando grande importância sócio-econômica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Dentre os vários tipos de carcinoma, o câncer de colorretal é o terceiro mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres (JEMAL et al., 2011). Compreende tumores que afetam um segmento do intestino grosso, o cólon, e o reto e estima-se a ocorrência de 32.600 novos casos da doença, dentre os quais 15.070 acometendo homens e 17.530 mulheres (INCA, 2014).

No âmbito do desenvolvimento de fármacos anti-tumorais, substâncias de origem natural tem sido muito estudadas, e representam 47,1% dos fármacos utilizados atualmente em clínica (NEWMAN; CRAGG, 2007). A própolis é uma mistura de resina de substâncias coletadas por abelhas (*Apis mellifera*) de diversas fontes vegetais (RIGHI et al., 2013) e vêm sendo considerada como uma fonte natural de grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN; CRAGG, 2007).

A própolis vermelha brasileira, obtida no nordeste do país, é a variedade mais recentemente identificada e possui compostos bioativos presentes em sua composição, como chalconas, pterocarpanos, isoflavonóides e polifenóis (TRUSHEVA et al., 2006). Esta se destaca por suas propriedades antitumorais apresentadas tanto em testes *in vitro* (BEGNINI, et al., 2014; FROZZA et al., 2014) quanto *in vivo* (KAMIYA et al., 2012), e em virtude disso, tem sido amplamente estudada.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade celular de células de adenocarcinoma de colorretal humano (linhagem HT-29) após tratamento com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha Brasileira (PVB), utilizando o ensaio de LIVE/DEAD.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. Obtenção do extrato de própolis vermelha

As amostras da própolis vermelha foram coletadas no nordeste brasileiro, na localidade de Brejo Grande (S10 ° 28'25" W e 36 ° 26'12") em setembro de 2011. O

extrato da própolis vermelha foi preparado a partir de 1g da própolis bruta, ao qual foi adicionado 10 mL de EtOH-H<sub>2</sub>O 70% (v/v). A mistura resultante foi filtrada e o solvente evaporado, obtendo-se um pó fino e vermelho, o qual foi mantido congelado (-20 °C). O pó armazenado foi utilizado no preparo de uma alíquota estoque pela diluição em solução hidroalcoólica 50%. Para as concentrações finais, a solução foi diluída em meio de cultivo celular (DMEM acrescido de 10% de SFB) nas proporções de 25 µg, 50 µg, 100 µg e 200 µg e após, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm antes de cada ensaio experimental.

## **2.2. Cultivo celular**

A linhagem celular de adenocarcinoma de colorretal humano (HT-29), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil), foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células cresceram em estufa com atmosfera controlada a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

## **2.3. Avaliação da viabilidade celular**

O ensaio de LIVE/DEAD (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) consiste em um kit comercial que combina reagentes fluorescentes para se obter a discriminação de duas cores, verde e vermelho, onde se pode distinguir a população de células vivas (coradas em verde) da população de células mortas (coradas em vermelho). Células vivas são capazes de internalizar a calceína e puderam ser analisadas por emissão de luz fluorescente verde (488 nm). O homodímero de brometo de etídio difunde-se através da membrana permeável de células mortas e liga-se ao DNA, sendo detectado pelo sinal fluorescente vermelho (546 nm).

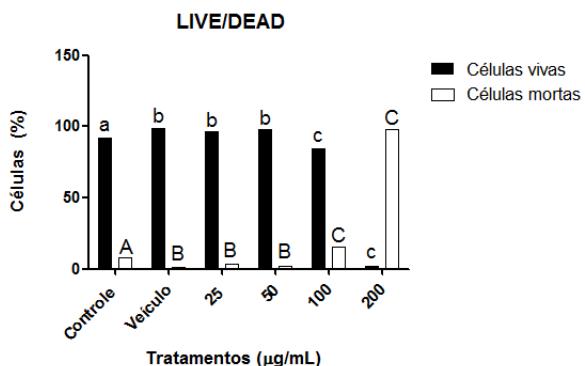
O ensaio foi realizado seguindo instruções do fabricante e posteriormente analisado por microscópio de fluorescência Olympus IX71 (Olympus OpticalCo., Tóquio, Japão) por imagem multicor. As imagens obtidas foram avaliadas utilizando o programa Cell^F software (Cell-F, Nova Iorque, EUA).

## **2.4. Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados através do teste exato de Fisher, utilizando o programa SPSS 16.0. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente relevantes.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O resultado do ensaio de LIVE/DEAD demonstrou uma diminuição na viabilidade celular nas células da linhagem HT-29 de modo dose-dependente após tratamento com PVB (Figura 1). Houve um aumento na morte celular(Fluorescência vermelha) nos tratamentos de maior concentração da própolis vermelha (100µg/mL e 200 µg/mL) em comparação com o grupo controle. O veículo (EtOH-H<sub>2</sub>O) e as concentrações de 25 µg/mL e 50µg/mL apresentaram taxas de morte celular similares entre si, sem muita discrepância em relação ao observado no grupo controle, não apresentando citotoxicidade. (Figura 1)



**figura 1:** percentual de células mortas e vivas em relação aos tratamentos de própolis vermelha administrados. letras minúsculas indicam taxa de células vivas e maiúsculas taxa de células mortas. diferentes letras representam diferença significativa.

Estudos anteriores já haviam relatado potencial ação anti-tumoral da própolis em diversos tipos de linhagens celulares, como de 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). Além disso, em um estudo recente de nosso grupo de pesquisa, foi relatado o efeito inibitório do extrato etanólico da própolis vermelha brasileira sobre a taxa de crescimento de células tumorais de bexiga. (BEGNINI et al., 2014).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a PVB, quando administrada em altas concentrações, apresenta atividade antitumoral, diminuindo a viabilidade celular em células de câncer de colorretal (HT-29). Sendo assim, a própolis vermelha brasileira pode ser uma alternativa futura de aplicação clínica para tratamento de câncer de colorretal. Porém, mais estudos precisam ser realizados no âmbito de elucidar os compostos bioativos presentes no processo anti-tumoral e as melhores concentrações a serem administradas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva:World Health Organization, 2008.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. *CA: a cancerjournal for clinicians*.;61(2):69–90. doi:10.3322/caac.20107 pmid:21296855, 2011.

INCA, Instituto Nacional do Câncer 2012. Acessado em 19 jul. 2015. Online Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/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.

RIGHI AA, NEGRI G, AND SALATINO A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. **Evid Based Complement Alternat Med** 2013:267878, 2013.

BEGNINI, K.R.; MOURA DE LEON, P.M.; THUROW, H.; SCHULTZE, E.; CAMPOS, V.F.; MARTINS RODRIGUES, F.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; SAVEGNAGO, L.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; COLLARES, T.; PÊGAS 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**, p.1-13, 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. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry** v.60, p.11065-11070, 2012.

FROZZA, C. O. S. ; RIBEIRO, T. S. ; GAMBATO, G. ; MENTI, C. ; MOURA, S. ; PINTO, P. M. ; STAATS, C. C.; PADILHA, F. F. ; BEGNINI, K. R. ; LEON, P.; BORSUK, S. ; SAVEGNAGO, L. ; DELLAGOSTIN, O. ; COLLARES, T. ; SEIXAS, F. K. ; HENRIQUES, J. A. P. ; ROESCH-ELY, M. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 195-204, 2014.

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.

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.

ASO, K.; KANNO, S.; TADANO, T.; SATOH, S.; 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.; 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.