

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CEPAS DE *Mycobacterium bovis* BCG FRENTE AO EXTRATO BRUTO DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA

VICTORIA MASCARENHAS BORBA¹; JULIETI HUCH BUSS¹; NATÁLIA VIEIRA SEGATTO¹; KARINE RECH BEGNINI²; JOÃO ANTÔNIO PÊGAS HENRIQUES³; FABIANA KÖMMLING SEIXAS²

¹ Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Graduação em Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – victoriamborba2@hotmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças que assola o mundo, sendo uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos. No Brasil, as estimativas para o ano de 2015 apontam a ocorrência de aproximadamente 576.580 casos novos de câncer. Segundo a Organização Mundial da Saúde, até o ano de 2030, podem-se esperar cerca de 27 milhões de casos e 17 milhões de mortes por câncer (INCA, 2014). Dentre os diferentes tipos tumorais, o câncer de bexiga é o segundo tumor urológico mais frequente, sendo o 4º tumor maligno mais comum nos homens e o 9º nas mulheres. No Brasil, possui uma estimativa de 8.940 novos casos, sendo 6.750 em homens e 2.190 em mulheres (INCA, 2014).

O tratamento mais eficaz atualmente disponível para câncer superficial de bexiga consiste na utilização de imunoterapia com *Mycobacterium bovis* BCG, sendo esta mais eficaz que a quimioterapia ou radioterapia localizadas (LUO Y. et al., 2010). A instilação intravesical de BCG para o tratamento de carcinoma de células transicionais de bexiga tem sido utilizada há três décadas e consiste na administração da vacina BCG diretamente na bexiga, através de um cateter. As células do sistema imunológico são atraídas para a bexiga e ativadas pelo BCG, que por sua vez afeta as células cancerígenas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

A própolis vermelha brasileira (PVB), um produto natural coletado de plantas por abelhas, é comumente usado em medicina popular e tem sido relatado por possuir diversas propriedades biológicas, tais como anticancerígena, antioxidante, e antibactericida (KAMIYA et al., 2012). Estudos realizados anteriormente comprovam o potencial antitumoral e apoptótico da PVB em células de carcinoma de bexiga (BEGNINI et al., 2014).

Tendo em vista os benefícios oferecidos pela utilização de *M. bovis* BCG na imunoterapia de câncer superficial de bexiga e as propriedades biológicas anticancerígenas e antibactericidas da própolis vermelha brasileira (PVB), este estudo tem por objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico da PVB sobre as cepas BCG Pasteur e BCG Pasteur $\Delta leuD$ de *M. bovis* BCG para possível combinação das duas alternativas de terapia, no tratamento de câncer superficial de bexiga.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação do extrato da própolis vermelha

As amostras de PVB foram coletadas no nordeste brasileiro (S10° 28'25" e W 36° 26'12") em setembro de 2011. O extrato hidroalcoólico da PVB foi preparado segundo a metodologia empregada por Frozza et al. (2013) e o extrato seco foi mantido congelado a -20°C e as concentrações finais (10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL) foram preparadas imediatamente antes do uso utilizando EtOH-H₂O 50% (v/v).

2.2. Cultivo do BCG

Para realização deste estudo, foram utilizadas duas cepas de BCG: a cepa comercial de BCG Pasteur, e a cepa BCG Pasteur $\Delta leuD$, que é auxotrófica para o aminoácido leucina. Essa segunda cepa possui um gene participante da rota de síntese do aminoácido leucina deletado de seu genoma. Sendo assim, essa cepa auxotrófica só cresce em meio de cultura onde se fornece a leucina, sendo, portanto um gene de seleção. As cepas foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9, suplementado com 10% de OADC, tween e, quando necessário, leucina.

2.3. Determinação da Concentração Celular

A determinação da concentração celular foi medida através de leitura de densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro a 600nm. Neste ensaio, à medida que aumenta a concentração de bactérias no meio, a quantidade de luz que é transmitida através do mesmo se torna reduzida, possibilitando uma estimativa de quantidade (BARKER et al., 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana constitui um método rápido, embora indireto, de estimar a concentração celular. Um feixe de luz focado numa suspensão microbiana é parcialmente desviado pelas células, e a percentagem de luz não desviada é medida por recurso a um espectrofotômetro. A quantidade de luz que atravessa a suspensão celular depende da concentração de células na suspensão e do tamanho destas, do comprimento de onda e da intensidade da luz incidente e do diâmetro do tubo que contém a suspensão celular (BARKER et al., 2010).

O extrato hidroalcoólico de PVB inibiu o crescimento bacteriano de BCG de forma dose-dependente, sendo a inibição inferior a 30% na cepa Pasteur e 45% na cepa Pasteur $\Delta leuD$ nas concentrações mais altas (100 e 200 µg/mL). Em concentrações mais baixas, 10 e 25 µg/mL, a inibição foi pouco significativa, sendo inferior 20%.

A Figura 1 representa os resultados obtidos durante a análise de inibição do crescimento de BCG com o tratamento utilizando extrato hidroalcoólico de PVB nas diferentes concentrações.

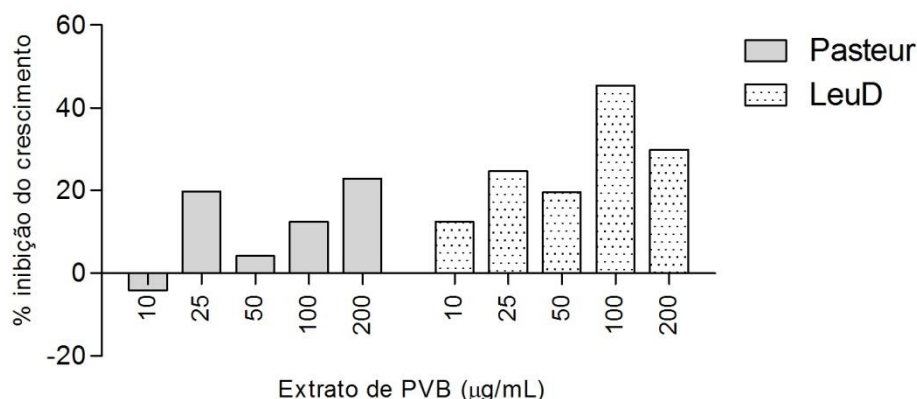


Figura 1: Taxa de inibição de crescimento celular nas cepas BCG Pasteur e BCG Pasteur $\Delta leuD$ nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$.

Tais resultados demonstram a possibilidade da combinação da própolis vermelha brasileira e do BCG no tratamento de câncer superficial de bexiga, visto que estudos comprovam que a própolis induz apoptose de células tumorais de bexiga (BEGNINI et al., 2014) e o BCG traz muitas vantagens na imunoterapia da mesma doença (LUO et al., 2010) além disso, cepas recombinantes de BCG Pasteur $\Delta leuD$ superexpressando Ag85B aumenta a citotoxicidade em células de câncer superficial de bexiga em modelo *in vitro*, e esse efeito pode ocorrer devido a apoptose (BEGNINI et al., 2013).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que a própolis vermelha brasileira apresentou inibição do crescimento de cepas de BCG em concentrações mais altas do extrato hidroalcoólico de PVB. Porém, em concentrações baixas, a inibição foi pouco significativa, sendo inferior a 20%. Dessa forma, a combinação das duas alternativas terapêuticas constitui uma alternativa viável e novos estudos se fazem necessários para o entendimento dos benefícios desta combinação em tratamentos de câncer superficial de bexiga.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Cancer Society 2015. Acessado em 2 jul. 2015. Online

Disponível em:

<http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-what-is-bladder-cancer>

BEGNINI K. R.; DE LEON P.; THUROW H.; SCHULTZE E.; CAMPOS V.; RODRIGUES F.; BORSUK S.; DELLAGOSTIN O.; SAVEGNAGO L.; ROESCH-ELY M.; MOURA S.; PADILHA F.; COLLARES T.; HENRIQUES J.; SEIXAS F. Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis-Like Cell Death and Decreases Migration Potential in Bladder Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2014, 2014.

BEGNINI K. R.; RIZZI C.; CAMPOS V.; BORSUK S.; SCHULTZE E.; YURGEL V.; NEDEL F.; DELLAGOSTIN O.; COLLARES T.; SEIXAS F. Auxotrophic recombinant *Mycobacterium bovis* BCG overexpressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013.

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.

INCA, Instituto Nacional do Câncer 2012. Acessado em 28 jun. 2015. Online Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>

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.

LUO Y.; HAN R.; EVANOFF D. P.; CHEN X. Interleukin-10 inhibits *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG) - induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells **Clinical & Experimental Immunology** v. 160, p. 359–368, 2010.