

## FRAÇÕES DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA INDUZEM APOPTOSE EM LINHAGEM DE CARCINOMA DE BEXIGA (5637)

RAQUEL ROMAN FAEDO <sup>1</sup>; LIZIANE PEREIRA DA SILVA <sup>1,2</sup>; KARINE RECH BEGNINI <sup>1,2</sup>; JULIETI HUCH BUSS <sup>1</sup>; JOÃO ANTONIO PÊGAS 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 -- [raquelrofa@hotmail.com](mailto:raquelrofa@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> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBio), Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil

### 1. INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga é uma doença neoplásica do urotélio, camada mais interna que reveste a bexiga. Dentre os tipos histológicos mais de 90% dos casos são representados pelo carcinoma urotelial ou também denominado carcinoma de células transicionais (HAMPL et al.2013). Ainda segundo este autor outros tipos histológicos como, carcinoma de célula escamosa e adenocarcinoma equivalem à minoria dos casos relatados. O carcinoma de células transicionais, são tumores não músculo invasivo que apresentam elevada tendência de recorrência (60% a 90%) e 30% de chance de progressão (ASKELAND et al. 2012).

O tratamento dependerá do grau de evolução da doença, em tumores superficiais utiliza-se a ressecção transuretral e associa-se a terapias adjuvantes, entre estas a imunoterapia com BCG é considerada padrão. Foi descrita por Morales et al., em 1976, e mostrou-se superior as outras intervenções quimioterápicas, com capacidade de redução da recorrência e da progressão do câncer de bexiga não músculo invasivo, devido a ação antineoplásica decorrente da resposta imunológica celular (THALMANN et al.2000). Contudo, a imunoterapia está frequentemente associada com efeitos adversos locais e/ou sistêmicos, incluindo sepse e, além disso, uma porcentagem dos pacientes não responde ao tratamento, principalmente os que apresentam o sistema imunológico debilitado como por exemplo, os idosos, que correspondem a mais de 70% dos casos de câncer de bexiga diagnosticados (KAUSCH et al. 2006). No entanto, até hoje, nenhum outro medicamento mostrou-se tão eficaz quanto o BCG.

Desta forma, é importante o desenvolvimento de novas terapias para o câncer de bexiga não músculo invasivo, que sejam eficazes e apresentem menores efeitos adversos que as terapias já utilizadas. Na busca de novos compostos para o tratamento deste tipo tumoral, estão os produtos naturais e seus componentes bioativos, que vem sendo amplamente investigados (MUDIT E EL SAYED 2016). Neste segmento encontra-se a Própolis Vermelha Brasileira (PVB), uma mistura resinosa complexa coletada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, que apresenta alto valor medicinal (BEGNINI et al. 2014). Algumas de suas propriedades farmacológicas já investigadas são atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, anticâncer, antiproliferativa e efeitos imunomodulatórios (FREIRES et al. 2016; KAMIYA et al. 2012)

Recentemente a caracterização química da PVB mostrou uma elevada concentração de ácidos fenólicos e flavonóides, tal como formononetina, liquiritigenina, medicarpina e biochanina A (OLIVIERI et al. 2013). Pela PVB ser uma mistura complexa, o seu fracionamento proporcionou uma melhor compreensão dos compostos presentes em cada uma das frações.

Em virtude dos relatos científicos citados à cima, tais como as propriedades farmacológicas e a necessidade de tratamentos mais efetivos, o objetivo deste trabalho foi investigar se as frações da PVB são capazes de promover apoptose celular em células humanas de câncer de bexiga.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Cultivo celular

A linhagem celular de carcinoma de bexiga humano (5637), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil), foram cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (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.

### 2.2. Citometria de fluxo

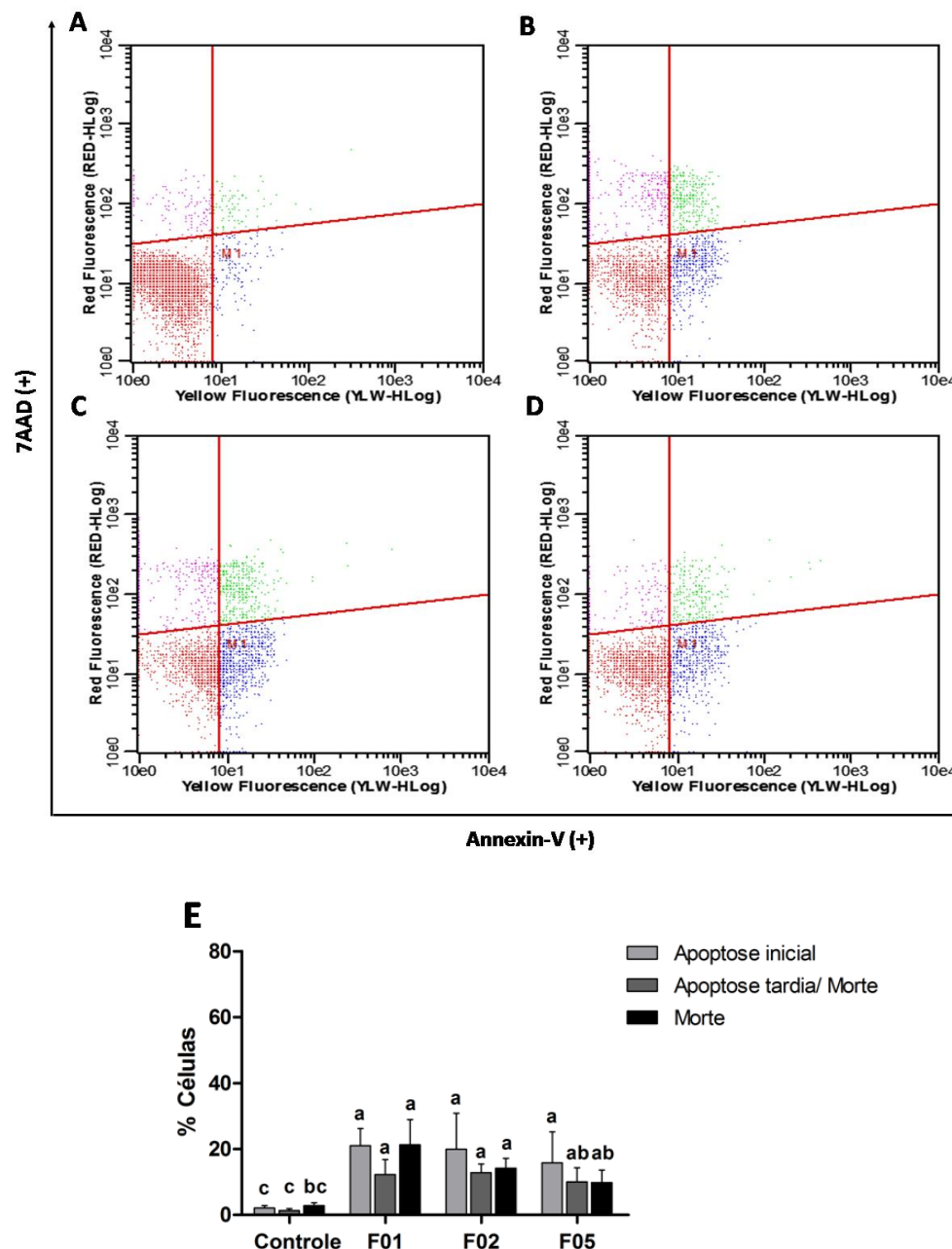
As células foram cultivadas em placa de 12 poços, numa densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço e incubadas por 24h. Posteriormente as células foram tratadas com as três frações da PVB (F01, F02 e F05), numa concentração de 12,5 µg/mL durante 48h. A apoptose celular foi determinada utilizando o kit de detecção de apoptose Annexin V-7AAD (Guava Technologies, Millipore Corporation), seguindo instruções do fabricante. Em uma variação de  $2 \times 10^4$  à  $1 \times 10^5$  de células tratadas (100 µL) foi adicionado 100 µL do reagente Guava Nexin. As células foram incubadas no escuro em temperatura ambiente por 20min, após as amostras foram submetidas a citometria de fluxo (Guava Flow Cytometry easyCyte System; Millipore Corporation), onde foram analisadas. Neste teste, resultado Annexin V negativo e 7-AAD positivo indica debris nucleares; Annexin V negativo e 7-AAD negativo indica células vivas; Annexin V positivo e 7-AAD negativo indica apoptose inicial e resultado Annexin V positivo e 7-AAD positivo indica apoptose tardia/ morte celular. Os resultados são reportados em porcentagem de células em cada fase de apoptose (inicial e tardia).

### 2.3. Análise estatística

Os dados de Apoptose inicial, tardia e morte foram analisados através do teste de variância two-way (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente relevantes.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos através da citometria de fluxo indicaram que as três frações da PVB (F01, F02 e F05) induziram apoptose em comparação ao controle. A fração F01 apresentou uma porcentagem elevada de células em estágio de apoptose, correspondendo a 54,6%, sendo que destas 21% foram classificadas como apoptose inicial e apenas 12,2% identificada como apoptose tardia. Nas demais frações, F02 e F05, esta mesma relação manteve-se, apoptose inicial foi de 19,9% e 15,7% e apoptose tardia de 14,2% e 9,8%, respectivamente (figura 1).



**Figura 1:** Análise de citometria de fluxo (Annexin V-7AAD) em célula 5637 após o tratamento com as frações F01, F02 e F05, na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  por 48h. (A) Grupo controle. (B) F01. (C) F02. (D) F05. (E) Percentual de células classificadas em apoptose inicial, apoptose tardia/morte e morte após tratamentos com as frações F01, F02 e F05. Diferentes letras representam diferenças significativa entre as mdias. Diferenças foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ .

Estudos anteriores já haviam relatado o potencial citotóxico do extrato bruto da Própolis Vermelha Brasileira (BEGNINI et al. 2014). Porém os dados apresentados neste trabalho demonstram que as frações escolhidas (F01, F02 e F05) também apresentam elevado potencial citotóxico e por meio da citometria de fluxo pode-se observar que vias de apoptose podem estar sendo ativadas após o tratamento das células de carcinoma de bexiga (5637) com as frações da PVB.

O efeito citotóxico encontrado justifica-se pelas elevadas concentrações dos compostos bioativos das frações, sendo majoritariamente flavonóides. Já que é

sabido que estas moléculas são agentes quimiopreventivos, capazes de realizar alterações biológicas, tais como ativar rotas de morte celular e induzir apoptose em células neoplásicas ou pré-neoplásicas (ABBAS et al. 2013).

Desta forma os resultados apresentam grande relevância, uma vez que as rotas de morte celular programada demonstram estar alteradas em células tumorais, o que favorece o rápido e desordenado crescimento de tumores.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que as frações da PVB, induziram o processo de apoptose em células de carcinoma de bexiga humano (5637), atribui-se este efeito a ação dos compostos presentes em elevadas concentrações com, flavonóides que segundo a literatura essas moléculas bioativas possuem efeito anticarcinogênico e um potencial quimiopreventivo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IARC, **International Agency for Research on Cancer**. Acessado em 28 jul. 2016. Online Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/home>.

A. MORALES, D. EIDINGER, AND A. W. BRUCE, "Intracavitary Bacillus Calmette Guerin in the treatment of superficial bladder tumors," **Journal of Urology**, vol. 116, no. 2, pp. 180–183, 1976.

THALMANN GN, SERMIER A, RENTSCH C, MOHRLE K, CECCHINI MG, STUDER EU. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guérin. **J Urol.**,164:2129-33, 2000.

ABBAS, A.; PATTERSON, W.; GEORGEL, P. T. The epigenetic potentials of dietary polyphenols in prostate cancer management. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 91, n. 6, p. 361–8, 2013.

ASKELAND, E. J. et al. Bladder cancer immunotherapy: BCG and beyond. **Advances in Urology**, v. 2012, n. II, 2012.

BEGNINI, K. R. et al. Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis-Like Cell Death and Decreases Migration Potential in Bladder Cancer Cells. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, 2014.

FREIRES, I. A.; ALENCAR, S. M. DE; ROSALEN, P. L. Pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016.

HAMPL, D.; AUGUSTO, A.; TOBIAS-MACHADO, L. K. M. CAPÍTULO 11 Câncer de Bexiga. In: **Urologia**. [s.l: s.n.]. p. 87–97.

KAMIYA, T. et al. Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in. **Journal of Agricultural and Food Chemistry Table**, v. 60, p. 11065–11070, 2012.

KAUSCH, I.; DOEHN, C.; JOCHAM, D. Recent improvements in the detection and treatment of nonmuscle-invasive bladder cancer. **Expert review of anticancer therapy**, v. 6, n. 9, p. 1301–11, 2006.

MUDIT, M.; EL SAYED, K. A. Cancer control potential of marine natural product scaffolds through inhibition of tumor cell migration and invasion. **Drug Discovery Today**, 2016.

OLIVIERI, C. et al. Chemical characterization , antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, 2013.