AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS ANTIOXIDANTES RUTINA, NARINGINA, NEOHESPERIDINA E RESVERATROL EM CÉLULAS TUMORAIS - Calu-3, HeLa e HRT.

Carlos Henrique Mazur (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Marcia Regina Paes de Oliveira (Co-orientadora), Carla Cristine Kanunfre (Orientadora), E-mail: cckanunfre@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral

Área e sub-área de conhecimento CNPq: Ciências Biológicas/Fisiologia

Palavras-chave: Viabilidade celular, redução de MTT, biointervenção.

Resumo

O câncer é um problema de saúde pública, que segundo dados estatísticos epidemiológicos, apresentam para o ano de 2020 uma previsão 9,3 milhões em países menos desenvolvidos, incluindo Brasil. Uma proposta de terapia complementar recomendada para paciente é o uso de antioxidantes. Desta forma o objetivo deste trabalho foi o avaliar a citotoxicidade dos antioxidantes, rutina, naringina, neohesperidina e resveratrol em linhagens celulares 3T3, Calu-3, HeLa e HRT. As células foram tratadas com os antioxidantes em diferentes concentrações (0-1000 μM) pelo período de 72h. A citotoxicidade dos compostos foi determinada pelo ensaio de redução de MTT que avalia o metabolismo celular e de SRB que quantifica proteínas, ambos os ensaios colorimétricos. Dos antioxidantes testados apenas o resveratrol foi tóxico para todas as linhagens celulares, com IC50 para 3T3, Calu-3, HeLa e HRT de 142,92; 567,45; 312,22 e 342,87 μM de forma podemos inferir que apenas este composto apresenta efeito antitumoral, que devido aos elevados IC50 obtidos apresentaria baixo efetividade. Os demais antioxidantes podem, pela ausência ou baixa toxicidade, serem empregados possivelmente como citoprotetores.

Introdução

O câncer é um problema de saúde pública, que segundo dados estatísticos epidemiológicos, apresentam para o ano de 2020 uma previsão de seis milhões de novos casos em países mais desenvolvidos e 9,3 milhões em países menos desenvolvidos (FREIRES et al., 2014).

Uma vez que o câncer é detectado, o seu tratamento baseia-se em cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou na combinação destes procedimentos. Os fármacos antineoplásicos são tóxicos, inclusive para as células normais, com ações bastante devastadoras (INCA, 2011).

Uma proposta de terapia complementar recomendada para paciente é o uso de antioxidantes. Os antioxidantes podem ser úteis na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia não somente por reduzir sua toxicidade e minimizar os efeitos colaterais as células normais da terapia e mais também por auxiliar na redução do tamanho do tumor e no aumento da longevidade dos pacientes (PASCHOAL; NAVES; FONSECA, 2012).

Os antioxidantes flavonoides são uma classe de compostos fenólicos que diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares. Diferentes flavonoides podem atuar em vários níveis do processo cancerígeno. Assim, os flavonoides poderiam inibir a carcinogênese (BEHLING et al., 2004). De fato, são considerados uma classe dos antioxidantes disponíveis para uso na terapia nutricional do câncer, sendo assim o objetivo deste trabalho é o avaliar a citotoxicidade dos compostos fenólicos rutina, naringina, neohesperidina e resveratrol.

Materiais e métodos:

Padronização de condições de cultivo e semeação das linhagens 3T3, Calu-3 e HeLa

As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e antibiótico (1mg de estreptomicina e 10000UI de penicilina) e mantidas em estufa umidificada a 37°C e com atmosfera de CO_2 a 5% condições ideais para seu crescimento.

Preparação da solução mãe de cada antioxidante

Os antioxidantes Rutina, Resveratrol, Neohesperidina e Naringina foram solubilizados em DMSO para obtenção de uma solução estoque na concentração de 500 mM. Todas as soluções mães/estoques foram armazenadas sob refrigeração no Freezer (- 20°C).

Tratamento celular e determinação da citotoxicidade

As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 8 x 10^3 células/poço/100µL. Após 24h na estufa as células foram tratadas com os antioxidantes na concentrações de 5, 50, 250, 500 e 1000 µM. O tratamento celular foi realizado pelo período de 72 horas, sendo após determinado a viabilidade celular pelos ensaios de redução do MTT e sulforodamina B (SRB). Após a determinação da viabilidade por MTT e SRB foram feitas as leituras em espectrofotômetro a 550 nm para MTT e 492 nm para SRB.

Resultados e Discussão

Viabilidade celular da linhagem controle 3T3 pelo ensaio colorimétrico empregando MTT e SRB

Verificou-se que os antioxidantes Rutina, Naringina e Neohesperidina não foram citotóxicos quando comparado com o grupo controle quando considerado o ensaio de redução do MTT. Já o Resveratrol nas concentrações de 50, 250, 500 e 1000 µM gerou uma diminuição da viabilidade celular de maneira dose dependente. Para a concentração de 50 µg/mL observou-se uma redução de 47%, para 250 µM de 66%, 500 µM de 77% e 1000 µM de 84%. O ensaio de SRB comprovou os ensaios de MTT, todavia as células quando expostas com a Rutina, apenas na concentração de 1000 µM, apresentaram uma redução a viabilidade celular de 51% comparada com o grupo controle. As células submetidas ao Resveratrol também tiveram uma redução na viabilidade celular nas concentrações de 50 µM com 44%, de 250 µM com 66%, de 500 µM com 65% e de 1000 µM com 67%.

Viabilidade celular da linhagem Calu-3 pelo ensaio colorimétrico empregando MTT e SRB

Para esta linhagem Calu-3 apenas o Resveratrol gerou uma alteração percentual significativa de perda da viabilidade celular nas concentrações de 250 µM com 35%, 500 µM chegando a 68% e 1000 µM com 54%, conforme revelado pelo ensaio do MTT. Também apenas o Resveratrol gerou alteração significativa comparado com os outros antioxidantes testados quando empregado o ensaio da SRB. Nas concentrações de 250 µM obteve-se um percentual de redução de viabilidade celular de 45%, já com 500 µM foi de 61% e 1000 µM chegou a 62%.

Viabilidade celular da linhagem HeLa pelo ensaio colorimétrico empregando MTT e SRB

A perda de viabilidade celular foi dose-dependente para o Resveratrol tanto para o ensaio de MTT quanto de SRB. No ensaio de MTT a concentração de 50 µM de Resveratrol com reduziu a viabilidade em 29%, para 250 µM em 49%, 500 µM com 61% e em 1000 µM em 68%. Quando comparado com o controle, no ensaio de SRB, apenas o resveratrol também gerou alteração significativa da viabilidade celular começando pela concentração de 5 µM com 18% de redução, seguindo com 250 µM com 55%, 500 µM com 32% e 1000 µM com 50%.

Viabilidade celular da linhagem HRT pelo ensaio colorimétrico empregando MTT e SRB

Para esta linhagem HRT também apenas o Resveratrol gerou uma perda significativa da viabilidade celular nas concentrações de 250 µM com 23%, 500 µM e 1000 µM com cerca de 80%, conforme revelado pelo ensaio do MTT. Resultados similares foram obtidos para o ensaio da SRB.

Os antioxidantes já vêm sendo empregados como antitumorais em estudos *in vitro* e *in vivo*. Todavia os pesquisadores relatam efeitos diferentes dos obtidos para Rutina, Neohespiridina, Naringina empregando concentrações menores das utilizadas. O resveratrol foi o único que evidenciou potencial como antitumoral. De fato a literatura, vem confirmando estes achados. Especificamente para câncer de pulmão Li et al, (2016) relataram que o resveratrol apresentou uma ação de citotoxicidade dependente da dose e dependente do tempo na viabilidade celular A549. O resveratrol também inibiu a proliferação, migração e invasão celular e promoveu a apoptose de maneira tempo-dependente de 0 a 72 horas. Estudos posteriores mostraram que o resveratrol inibiu a transcrição do RNA mensageiro e a expressão proteica de STAT-3.

Conclusões

O resveratrol, dos antioxidantes testados foi o único que apresentou efeito antitumoral, todavia podemos considerá-lo baixo devido aos elevados IC50 obtidos. Os demais antioxidantes podem, pela ausência ou baixa toxicidade, serem empregados possivelmente como citoprotetores, podendo ser úteis na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia e assim minimizar os efeitos colaterais as células normais, sugestões que precisariam ser elucidada em experimentos posteriores.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Araucária pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e a Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo suporte de pesquisa.

Referências:

AHMAD, M.; JUBER, A.; HUSSAIN, A.; BADARUDDEEN; ARSHAD, M.; MISHRA, A. Development of a new rutin nanoemulsion and its application on prostate carcinoma PC3 cell line. **EXCLI Journal** v.16, n.810-823, 2017.

BANJERDPONGCHAI, R.; WUDTIWAI, B.; KHAWON P. Induction of Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Apoptosis by Naringin. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** v.17, n.7, 2016.

BANJERDPONGCHAI, R.; WUDTIWAI, B.; KHAWON, P.; DUANGNIL, R.; KONGTAWELERT, P. Hesperidin from Citrus seed induces human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis via both mitochondrial and death receptor pathways. **Tumour Biology** v.37 (1), n.227-237, 2016.

LI X.; WANG D.; ZHAO Q. C.; SHI T., CHEN J Resveratrol Inhibited Non-small Cell Lung Cancer Through Inhibiting STAT-3 Signaling. **Americam Journal Medical Science** v.352 (5), p. 524-530, 2016.