



AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO FENÓLICO ÁCIDO GENTÍSICO NAS LINHAGENS TUMORAIS DE FÍGADO (HEPG2/C3) E DE RIM (786-O) *IN VITRO*

Vinicius Rodrigues Camilo da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Matheus Gimenez Buzo, Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora), e-mail: vinicius_080@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências Biológicas/ Maringá, PR.

Genética/Mutagênese

Palavras-chave: Citotoxicidade, ácido fenólico, cultura celular.

Resumo: Os compostos fenólicos, presentes em frutas e legumes, são muito estudados por apresentarem atividades farmacológicas e nutricionais, além de contribuírem para a cor, adstringência e aroma dos alimentos que o possuem em sua composição. O ácido gentísico é um ácido fenólico derivado do ácido salicílico e está presente principalmente em frutas e outros vegetais. É conhecido pelo efeito antioxidante, anti-inflamatório e anti-reumático. Diante disto, este trabalho investigou, usando o teste do MTT, a citotoxicidade do ácido gentísico em cultura de células de tumor de fígado humano (HepG2/C3A) e de tumor de rim humano (786-O). Para esse teste, em ambas as linhagens, foram utilizadas cinco concentrações de ácido gentísico: 10, 20, 30, 40 e 50 μM ; um controle com meio de cultura (DMEM) e Soro Bovino Fetal 10%, e um conhecido agente citotóxico, o MMS (Metil Metano Sulfonato) a 100 μM . As linhagens ficaram expostas aos tratamentos por 24, 48 e 72 horas. A leitura das absorbâncias mostrou que o ácido gentísico não foi citotóxico para as células renais em nenhuma das concentrações e tempos testados, mas diminuiu consideravelmente a proliferação das células hepáticas nas concentrações de 30, 40 e 50 μM , a partir do tempo de 24 horas. Mais investigações sobre a ação do ácido gentísico devem ser realizadas, para reforçar os dados obtidos.

Introdução

Os componetes da alimentação humana vêm sendo amplamente estudados, já que a mesma é considerada a principal porta de entrada de substâncias no organismo. Essas substâncias podem ser benéficas, como no caso dos





antioxidantes e antitumorais, ou malélicas, como os agentes carcinogênicos e mutagênicos (SERVAN-SCHREIBER, 2008).

Nesse contexto, os ácidos fenólicos são importantes por estarem em grande quantidade na composição de frutas e legumes, juntamente com carotenoides e vitaminas C e E, fatores que tornam esses compostos um excelente antioxidante. No grupo dos ácidos fenólicos encontra-se o ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), um biossintético derivado do ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), que apresenta efeito antioxidante, anti-inflamatório e antirreumático (CUNHA *et al.*, 2011). Ele é encontrado em frutas cítricas, uva, alcachofra de Jerusalém, gergelim, gencianas, sândalo vermelho e oliveira e, portanto, está presente no azeite de oliva virgem (GODOY-CABALLERO *et al.*, 2012).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial citotóxico do ácido gentísico, por meio do teste do MTT, em células tumorais de fígado humano (HEPG2/C3A) e de rim (786-O).

Materiais e métodos

Linhagem celular – HepG2/C3A e – 786-O

As células das linhagens HepG2/C3A e 786-O foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm², contendo meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), e mantidas em estufa com CO₂ a 5% e 37°C.

Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

A avaliação da citotoxicidade do composto ácido gentísico foi determinada pelo ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), segundo ensaio descrito por Mosmann (1983). Uma suspensão de 100µL, contendo 10⁴ células foi cultivada em placas de 96 poços, por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após a estabilização, foram tratadas com cinco concentrações do composto ácido gentísico: 10, 20, 30, 40 e 50 µM, um controle composto por meio de cultura (DMEM) e soro bovino fetal, e um tratado com o agente citotóxico MMS (Metil Metano Sulfonato) (100µM). As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, os tratamentos foram descartados e em seguida uma solução de meio de cultura com MTT (0,15mg/mL) foi adicionada, incubando as placas por mais 4 horas. Após este período, o meio foi retirado e em cada poço foi feita a solubilização dos cristais de formazan com 100µL de DMSO. A absorbância foi obtida por meio da leitura das placas em espectrofotômetro a 550nm, e os dados foram expressos em absorbância. A análise das absorbâncias médias e a análise estatística foram realizadas por análise de variância (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste de Dunnett





($\alpha=0,05$, $p<0,05$, $n=3$). As análises foram realizadas com auxílio do programa GrafPad InStat versão 3.02.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com a leitura de absorbância por espectrofotômetro tanto para a linhagem HepG2/C3A quanto para a linhagem 786-O estão representadas na Tabela 1, respectivamente. Os testes demonstraram que para a linhagem HepG2/C3A, o ácido gentísico foi citotóxico nas concentrações de 30, 40 e 50 μM em todos os tempos de exposição. Além disso, as concentrações de 10 e 20 μM apresentaram potencial citotóxico quando comparadas ao controle, no tempo de 72 horas. Para a linhagem 786-O o composto em análise não foi considerado citotóxico nas concentrações testadas em nenhum tempo de tratamento.

Corroborando com os resultados encontrados, o trabalho de Lin et al. (2015) demonstrou por meio da análise de citotoxicidade do extrato etanólico de *Litchi chinensis*, o qual contém ácido gentísico em alta concentração (30,26mg/g), que este possui atividade citotóxica nas linhagens tumorais de mama (MCF-7), fígado (HepG2/C3A), pulmão (A549) e nasofaringe (KB), sendo que para as células de hepatocarcinoma esse efeito mostrou-se mais efetivo. Em relação as células de nefrocarcinoma (786-O) possivelmente o ácido gentísico não se mostrou citotóxico devido à uma maior resistência dessas células devido a sua função excretora no organismo.

Tabela 1 – Absorbância Média obtida com o Ensaio de Citotoxicidade do MTT, em células das linhagens 786-O e HepG2/C3A expostas a cinco concentrações de Ácido Gentísico (AG) e um tratamento com Metil Metano Sulfonato (MMS) por 24, 48 e 72 horas.

Células	786-O			HepG2/C3A		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Controle	1,3 \pm 0,03	1,7 \pm 0,04	2,5 \pm 0,15	0,9 \pm 0,11	1,2 \pm 0,04	1,2 \pm 0,1
MMS (100 μM)	0,9 \pm 0,02*	0,2 \pm 0,02*	0,3 \pm 0,01*	0,4 \pm 0,03*	0,3 \pm 0,03*	0,3 \pm 0,03*
AG 10 μM	1,3 \pm 0,04	1,7 \pm 0,09	2,6 \pm 0,1	0,8 \pm 0,06	1,2 \pm 0,07	1,1 \pm 0,12*
AG 20 μM	1,2 \pm 0,06	1,6 \pm 0,03	2,4 \pm 0,35	0,9 \pm 0,06	1,1 \pm 0,05	1,0 \pm 0,09*
AG 30 μM	1,3 \pm 0,06	1,9 \pm 0,1	2,5 \pm 0,31	0,8 \pm 0,05*	1,0 \pm 0,08*	1,0 \pm 0,12*
AG 40 μM	1,3 \pm 0,04	1,8 \pm 0,1	2,6 \pm 0,27	0,8 \pm 0,05*	1,1 \pm 0,07*	1,0 \pm 0,09*
AG 50 μM	1,3 \pm 0,06	2,1 \pm 0,22	2,7 \pm 0,15	0,8 \pm 0,09*	0,9 \pm 0,06*	1,0 \pm 0,14*

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$)





Conclusões

Analisando os dados obtidos concluiu-se que o ácido gentísico apresenta citotoxicidade diferencial, sendo citotóxico para as células humanas de hepatocarcinoma e não citotóxico para as células humanas de nefrocarcinoma.

Agradecimentos

Ao pessoal do Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental que me auxiliaram na realização do trabalho, em especial à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Veronica Elisa Pimenta Vicentini e a Fundação Araucária.

Referências

CUNHA, J. F; SOUZA, M. C; SCHAFRANSKI, V. C; PAULINO, N; Avaliação da atividade imunomodulatória do ácido gentísico em camundongos. Disponível em: <<http://prodapys.com.br/navega.php?idioma=eneitem=pesquisaesub=25>>. Acesso em: 07 mar. 2016.

GODOY-CABALLERO, M. P; ACEDO-VALENZUELA, M. I; GALEANO-DIAZ, T. Simple quantification of phenolic compounds present in the minor fraction of virgin olive oil by LC-DAD-FLD. **Talanta**. Amsterdã, v. 101, p. 479-487, 2012.

LIN, J. T; CHANG, Y. Y; CHEN, Y. C; HU, C. C; CHANG, Y. P; HSU, S. H; YANG, D. J; Induction of apoptotic death of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells by ethanolic extract from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) flower. **Journal of Functional Foods**. Amsterdã, v. 19, p. 100-109, 2005.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. Amsterdã, v. 65, p. 55-63, 1983.

SERVAN-SCHREIBER, D. **Anticâncer**: Prevenir e vencer usando nossas defesas naturais. Rio de Janeiro: Objetiva, 2008.

