

## **AValiação DA MUTAGENICIDADE DO COMPOSTO NATURAL BROMELINA EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS**

Vanessa de Brito Pereira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Veronica Elisa Pimenta  
Vicentini (Orientador), e-mail: veronicaepvicentini@gmail.com.

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

### **Ciências Biológicas / Mutagênese**

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, Ensaio do Micronúcleo, Fitoterapia.

### **Resumo:**

A bromelina é um complexo enzimático encontrado em diferentes estruturas de plantas da família Bromeliaceae, sendo o abacaxi a sua principal fonte. Este complexo é constituído principalmente por proteases, cuja ação enzimática é amplamente empregada na indústria e na medicina, apresentando aplicações terapêuticas como ação anti-inflamatória e antitumoral. Linhagens de células humanas são modelos experimentais simplificados e informativos para pesquisas com diferentes finalidades e são amplamente utilizadas na pesquisa toxicológica. A cultura de linfócitos de sangue periférico humano representa um dos melhores métodos disponíveis para investigação citogenética, uma vez que é de fácil obtenção e bom crescimento em culturas de longos períodos, além de ser possível avaliar a resposta proliferativa dessas. Desta forma, devido as diversas propriedades biológicas exibidas pela bromelina, o presente estudo buscou avaliar em cultura de linfócitos humanos, o potencial mutagênico da bromelina por meio do teste do micronúcleo, a fim de avaliar possíveis danos induzidos por este composto. Os resultados estatísticos demonstraram que as concentrações de 5; 7,5 e 10 µg/mL de bromelina não exibiram potencial mutagênico em cultura de linfócitos, pois não houve aumento da frequência de micronúcleos. Além disso, também não foi observado redução da proliferação celular, portanto este é um composto seguro para uso.

### **Introdução**

A bromelina é um complexo constituído principalmente por tiol-endopeptidases, além de possuir fosfatases, glicosidases, peroxidases, celulasas, ribonuclease, glicoproteínas, carboidratos e outros. Este complexo enzimático é encontrado em plantas da família Bromeliaceae, sendo o abacaxi, *Ananas comosus* L. Merrill, a fonte de bromelina mais conhecida e comercializada (NOVAES et al., 2016). Devido a sua baixa toxicidade, a

bromelina tem sido aceita como um medicamento fitoterápico utilizado há vários anos nos Estados Unidos e na Europa como alternativa ou complemento em terapias com glicocorticoides, anti-inflamatórios não esteroides e agentes imunomoduladores (CHOBOTOVA et al., 2010).

Tendo em vista a cultura de células, os linfócitos de sangue periférico humano representam um grande método disponível para investigação citogenética, uma vez que é possível avaliar a resposta proliferativa dessas células. Por ser abundante na corrente sanguínea e a facilidade em obtê-lo, torna-o um modelo *in vitro* bastante vantajoso para diversas pesquisas, como as de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, oferecendo ainda facilidades metodológicas e fácil obtenção (punção venosa).

Dentre os ensaios que avaliam a indução de danos, um dos mais empregados é o ensaio de micronúcleo. Os micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que se perderam durante a divisão celular e não foram incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose, permanecendo no citoplasma das células interfásicas, e então uma membrana nuclear forma-se em volta do fragmento originando um pequeno micronúcleo separado do núcleo principal (FENECH, 2000).

Este ensaio é utilizado na detecção de efeitos clastogênicos (quebras cromatídicas e cromossômicas) e/ou aneugênicos (aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), causados por agentes potencialmente mutagênicos. Resultados positivos fornecem evidências de mutagenicidade sistêmica do composto avaliado, enquanto que os resultados negativos demonstram que a substância teste não é mutagênica *in vivo* ou *in vitro* (RIBEIRO et al., 2003).

Considerando o consumo do complexo enzimático bromelina na dieta, o presente trabalho buscou avaliar seu potencial mutagênico, em cultura de linfócitos de sangue periférico humano, tratado *in vitro*.

## **Materiais e Métodos**

### *Solução tratamento*

A bromelina foi obtida de fonte comercial (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). As concentrações utilizadas nos experimentos foram definidas com base na literatura e após a realização de testes-piloto.

### *Cultura de linfócitos a partir do sangue total e ensaio do Micronúcleo*

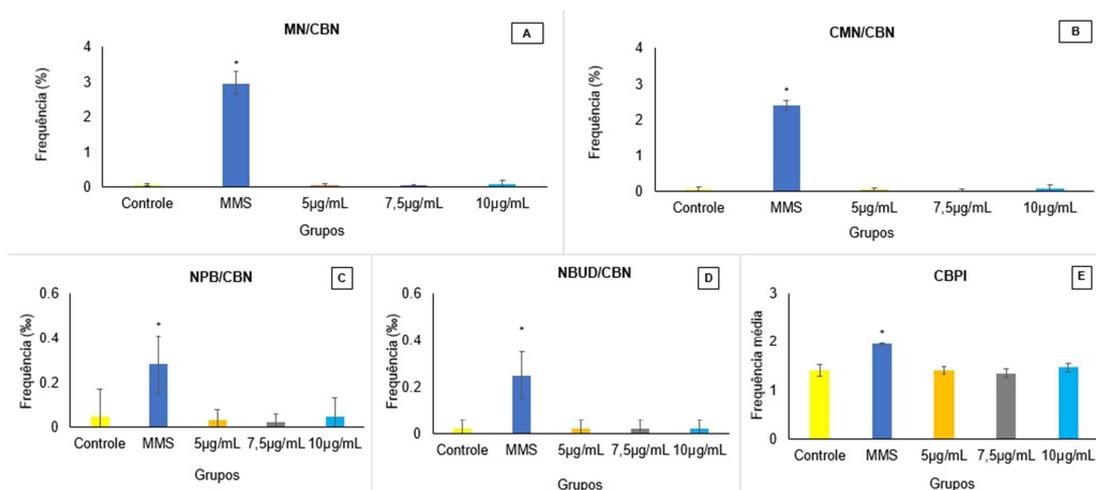
A cultura de linfócitos de sangue periférico humano foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Moorhead et al. (1960) com modificações. Foi coletado 40 mL de sangue periférico humano em seringa descartável heparinizada. O número amostral foi de 3 doadores, com duas repetições para cada doador.

Os linfócitos foram isolados do sangue total com Ficoll Paque Plus. Em cada frasco de cultura contendo 5 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de fitohemaglutinina A, foi adicionado uma suspensão de  $1 \times 10^6$  células/mL. Os frascos foram incubados a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após as 44 horas de incubação, as culturas foram tratadas individualmente com as concentrações de 5, 7,5 e 10 µg/mL de bromelina. Posteriormente, foi adicionado 6 µg/mL de citocalasina B para indução do bloqueio de citocinese, e os frascos foram novamente incubados por mais 28 horas.

Ao final de 72 horas de incubação, as culturas foram transferidas para tubos de 15 mL e submetidas a centrifugação (800 rpm, por 5 min.). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 5 mL de solução hipotônica gelada (KCl 0,075M), os tubos foram novamente submetidos a centrifugação. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 5 mL de fixador (metanol: ácido acético - 3:1), seguido de centrifugação. Esse processo foi repetido duas vezes.

Por fim, a suspensão de células foi gotejada sobre lâminas previamente limpas, e após secarem, estas lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5%, por 5 minutos. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz, com aumento de 1.000x, e ao final foi realizada a análise estatística utilizando o teste *t* não pareado, com o auxílio do programa *GrafPad Instat versão 3.02*.

## Resultados e Discussão



**Figura 1** - Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese em culturas de linfócitos humanos tratados com 5; 7,5 e 10 µg/mL de bromelina. Os valores são relatados como média ± desvio padrão. CBN: célula binucleada; (A) MN: micronúcleos; (B) CMN: célula com um ou mais micronúcleos; (C) NPB: pontes nucleoplasmáticas; (D) NBUD: brotos nucleares; (E) CBPI: índice de proliferação com bloqueio de citocinese. Controle, meio completo; controle positivo, 100 µM de metilmetanossulfonato (MMS). Os dados são baseados em dois experimentos independentes, n=3; número de células binucleadas analisadas para

cada indivíduo em cada repetição = 1.000. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ).

Os resultados indicaram que as culturas expostas as concentrações de 5, 7,5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  de bromelina não sofreram aumento no número total de micronúcleos (MN), e na frequência de pontes nucleoplasmáticas (NPB), bem como de brotos nucleares (NBUD), além de não causarem efeito citotóxico, pois não houve redução da proliferação celular como demonstrado pelo índice de proliferação celular com bloqueio de citocinese (CBPI). Nenhuma concentração foi estatisticamente significativa quando comparada com o controle, porém, o controle positivo (MMS) apresentou resultado estatisticamente significativo, demonstrando a responsividade do teste (Figura 1).

## Conclusões

As concentrações de bromelina utilizadas no presente estudo não induziram citotoxicidade e mutagenicidade em cultura de linfócitos humanos, demonstrando que este composto presente no abacaxi, além de apresentar várias aplicações terapêuticas, também mostrou segurança para uso.

## Agradecimentos

Agradeço ao Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental-DBC/UEM, SETI-PR e ao CNPq, órgão financiador deste projeto.

## Referências

CHOBOTOVA, K.; VERNALLIS, A. B.; MAJID, F. A. A. Bromelain's activity and potential as anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. **Cancer Letters**, v. 290, p. 148-156. 2010.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

NOVAES, L. C. L.; JOZALA, A. F.; LOPES, A. M.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; MAZZOLA, P. G.; JUNIOR, A. P. Stability, Purification, and Applications of Bromelain: A Review. **Biotechnology Progress**, v. 31, p. 5-13, 2016.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome Preparations of Leucocytes Cultured from Human Peripheral Blood. **Experimental Cell Research**, v. 33, n. 3, p. 613-616, 1960.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**, Canoas: ULBRA, 2003.