

## INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA DO COMPOSTO NATURAL BROMELINA EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Gabriela Terue Rizzo Kodama (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Vanessa De Brito Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Michele Cristina Heck (Coorientadora), Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora), e-mail: gabrielarizzokodama@gmail.com

Universidade Estadual De Maringá/ Centro De Ciências Biológicas/ Maringá, PR

### Ciências Biológicas/ Mutagênese

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, Ensaio do Cometa, Fitoterapia

### Resumo:

A bromelina é um composto natural que pode ser encontrado em plantas da família Bromeliaceae. Este complexo proteico possui ação enzimática, além de ser utilizado na medicina por sua ação terapêutica, anti-inflamatória e antitumoral. Culturas de células humanas como os linfócitos são modelos experimentais simplificados e informativos para pesquisas, como a toxicológica. O objetivo do presente estudo foi avaliar em cultura de linfócitos humanos, o potencial genotóxico da bromelina por meio do teste do cometa, a fim de avaliar possíveis danos induzidos por este composto. Para tanto, foram selecionados três doadores e coletados 40mL de sangue de cada e realizado o isolamento e cultivo *in vitro* dos linfócitos. Após 44 horas do início do cultivo os frascos receberam os tratamentos por 3 horas, sendo grupos: Controle, MMS (metilmetanosulfonato – indutor de danos), 5; 7,5 e 10 µg/mL de bromelina. Posteriormente, foi realizado a colheita das células, incorporação em lâminas pré-gelatinizadas com agarose, a lise e corrida eletroforética. Uma alíquota da suspensão celular foi utilizada para a análise de viabilidade celular com azul de trypan. Não foi possível a análise dos dados do ensaio do cometa até o presente momento, no entanto, os resultados de viabilidade celular demonstraram que nenhuma das concentrações de bromelina testadas apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle. Portanto, dentro das condições do estudo a bromelina não apresentou atividade citotóxica em linfócitos humanos.

### 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 mais conhecida e comercializada. Devido a sua baixa toxicidade, a Bromelina tem sido aceita como um medicamento fitoterápico, utilizado há vários anos como alternativa ou complemento em terapias com glicocorticoides, anti-inflamatórios não esteroides e agentes imunomoduladores (CHOBOTOVA et al., 2010).

Diferentes delineamentos experimentais permitem compreender melhor a atividade de diversos compostos como a Bromelina, e desta forma validar sua eficácia para uso. A cultura de linfócitos permite avaliar a resposta proliferativa dessas células, bem como suas respostas imunológicas envolvendo as cascatas bioquímicas. Além disso, os linfócitos são de fácil aquisição (pela punção venosa de sangue periférico humano), sendo abundantes na corrente sanguínea, e bastante vantajosos para diversos estudos, podendo ser coletados livres de contaminação, e manipulados por um longo período. Pesquisas desenvolvidas a partir da cultura de linfócitos de sangue periférico humano demonstram sua eficiência e responsividade para uso em investigação de citotoxicidade e genotoxicidade de produtos naturais.

Linfócitos cultivados *in vitro* podem ser empregados no teste Cometa, que é um método que possibilita a observação de danos e reparos no DNA. As células com dano aumentado mostram um aumento na migração de DNA cromatídico do nucleóide em direção ao ânodo na eletroforese, que se assemelha à forma de um cometa (SPEIT; HARTMANN, 1999). Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos álcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial genotóxico da Bromelina, em cultura de linfócitos de sangue periférico humano, tratada *in vitro*.

## Materiais e métodos

### *Solução tratamento*

A Bromelina foi obtida da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), CAS nº37189-34-7. As concentrações utilizadas nos experimentos foram definidas com base na literatura e após a realização de testes-piloto, sendo: 5, 7,5 e 10 µg/mL de Bromelina.

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

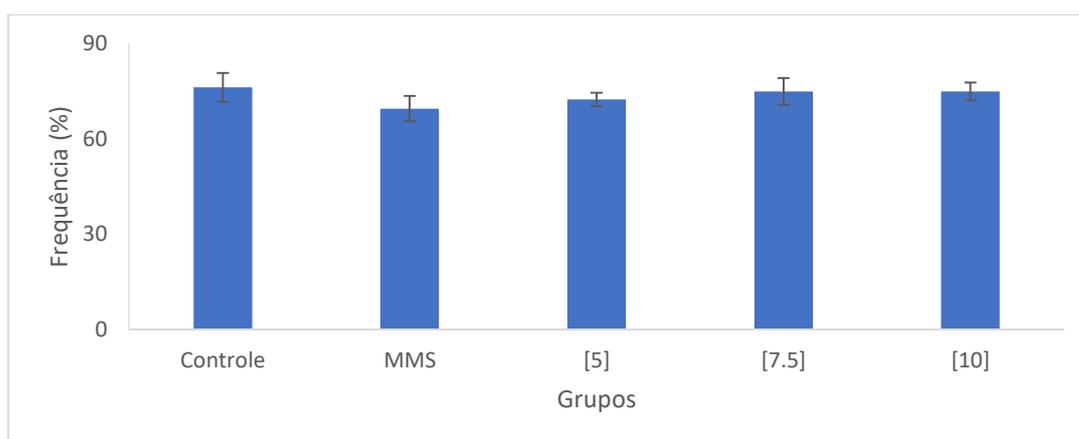
A cultura de linfócitos de sangue periférico humano foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Moorhead et al. (1960) com modificações. Respeitando todos os preceitos estabelecidos pelo comitê de ética, foi coletado 40mL de sangue periférico humano em seringa descartável heparinizada. O número amostral foi de 3 doadores, com duas repetições para cada doador. O delineamento consistiu em 5 grupos sendo: Controle, MMS (metilmetanosulfonato – indutor de danos), 5; 7,5 e 10 µg/mL de Bromelina.

Os linfócitos foram isolados do sangue total com Ficoll Paque Plus. Em cada frasco de cultura contendo 5mL 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 44 horas de incubação, as culturas receberam os respectivos tratamentos e após 3 horas foi realizada a colheita das células. Seguida da centrifugação por 5 minutos a 1.250 rpm, o sobrenadante foi descartado e uma suspensão celular de 40µL de células foi adicionada a 120µL de agarose de baixo ponto de fusão e na sequência depositada em lâminas pré-gelatinizadas com agarose normal. As lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas para a geladeira por 20 min. Após esse período, as lamínulas foram removidas, e as lâminas submetidas a lise por 1h30. Subsequentemente, foram colocadas em cuba de eletroforese por 20 min., seguido da eletroforese alcalina (25V, 300mA, 20 min). Após a corrida, as lâminas foram neutralizadas,

fixadas e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Uma alíquota de 20µL da suspensão celular foi utilizada para a análise da viabilidade celular com azul de trypan. As lâminas da viabilidade celular foram analisadas em microscópio de luz, com aumento de 400x, e para a análise estatística foi utilizado o teste de Tukey com o auxílio do programa *GrafPad Instat versão 3.02*. Os dados do ensaio do cometa até a presente data não puderam ser obtidos, pois os microscópios de fluorescência do DBC e da Instituição, apresentam problemas operacionais que impedem a análise. A solicitação de autorização para a compra das lâmpadas, que permitirão a análise, foi aprovada no início do mês de agosto, portanto, resta realizar a compra e a substituição. Assim que for efetivada a troca, a análise iniciará simultaneamente.

## Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na análise de viabilidade indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o controle. Portanto, todos os tratamentos apresentaram um percentual de viabilidade celular acima de 72%, respectivamente, 72,5; 75 e 75 % para as concentrações de 5; 7,5 e 10 µg/mL de Bromelina. Somente o tratamento com MMS apresentou viabilidade inferior a 70%, no entanto, esse dado não diferiu significativamente do controle (Figura 1).



**Figura 1** – Ensaio de Viabilidade Celular com azul de trypan. Dados apresentados como média e desvio padrão da análise de 100 células analisadas por repetição para cada doador em cada grupo: Controle; MMS (Metilmetanosulfonato) e as três concentrações de bromelina testadas 5; 7,5 e 10 µg/mL ( $p < 0,05$ ).

Diferente dos resultados obtidos no presente estudo, Godoy (2018), verificou que 10µg/mL de bromelina apresentou efeito citotóxico em células de carcinoma hepático (HepG2/C3A), mas, trata-se de uma linhagem celular diferente da utilizada e principalmente, uma linhagem tumoral, enquanto a deste estudo são células de linfócitos coletadas de indivíduos saudáveis.

## Conclusões

As concentrações de Bromelina utilizadas no presente estudo não induziram citotoxicidade em cultura de linfócitos humanos.

## Agradecimentos

Agradecemos 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**, Amsterdã, v. 290, p. 148-156. 2010.

GODOY, M. A. F. **Avaliação da atividade citotóxica, genotóxica e modulação da expressão gênica do composto Bromelina em células humanas de carcinoma renal (786-0) e hepático (HepG2/C3A)**. Maringá, PR: 2018. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia Ambiental). Universidade Estadual de Maringá, 62p, 2018.

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**, Amsterdã, v. 33, p. 613-616, 1960.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, Berlim, v. 113, p. 203-212, 1999.