

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DO COMPOSTO NATURAL NARINGINA *IN VITRO* EM CÉLULAS RENAIIS 786-O

Myllena Borges Miguel (PIBIC/CNPq), Gabriel de Oliveira Correia, Michele Cristina Heck, Mariane Aparecida Franco de Godoy, Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora). E-mail: vepvicentini@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Genética / Mutagênese.

Palavras-chave: Flavonoides; Carcinoma renal; Teste do MTT.

RESUMO

A Naringina, um flavonoide encontrado naturalmente em plantas, apresenta capacidades terapêuticas que podem ser exploradas, como por exemplo, seu potencial antitumoral. Portanto, o objetivo do estudo foi investigar a ação citotóxica e genotóxica da Naringina em linhagem 786-O. Para isso, no ensaio do MTT a cultura celular foi exposta nos períodos de 24, 48 e 72 horas às concentrações de 5, 50, 100, 150, 200 e 250 μM . Posteriormente, para o ensaio do cometa a cultura foi exposta por 3 horas às concentrações de 50, 100 e 150 μM . O teste do MTT revelou ação citotóxica da Naringina no período de 24 horas, nas concentrações de 50 a 250 μM ; em 48 horas, em 150 μM ; e 72 horas, de 150 a 250 μM . Uma viabilidade menor que 80% foi observada nas concentrações de 150 μM (48 e 72 horas) e 250 μM (72 horas). Durante a realização do ensaio do cometa houveram problemas técnicos (falta de energia elétrica) que inviabilizaram as amostras e, portanto, as análises destes ensaios não foram concluídas. Com base nos dados obtidos, mais testes devem ser realizados a fim de elucidar a ação deste flavonoide frente a linhagem celular avaliada.

INTRODUÇÃO

Os flavonoides, compostos naturais encontrados em plantas, apresentaram diversas aplicações na indústria e são usados tradicionalmente na medicina chinesa por conta de suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Fang *et al.*, 2006). Um exemplo dessa classe de compostos é a Naringina 4', 5, 7-trihidroxi flavanona-7-rhamnoglucosideo (PubChem CID: 442428), um flavonoide que pode ser encontrado normalmente em frutas cítricas, e possui a fórmula molecular de $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$ (PM 580,5g/mol) (PubChem, 2005). Considerando suas propriedades medicinais, atualmente a Naringina vem sendo pesquisada para a investigação de sua capacidade antitumoral, como pode ser observado na revisão de Chen *et al.* (2016). Dessa forma, o objetivo geral deste projeto foi a investigação dos efeitos citotóxicos (inibição da divisão celular) e genotóxicos (danos no DNA) da Naringina por meio do

teste do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) e do ensaio do Cometa, respectivamente, em linhagem de carcinoma renal 786-O.

MATERIAIS E MÉTODOS

Solução de tratamento e cultura da linhagem 786-O

Para o tratamento, foi utilizado Naringina (Sigma, CAS 10236-47-2) nas concentrações de 5, 50, 100, 150, 200 e 250 μM , dissolvida no início dos experimentos em tampão fosfato salino (PBS), e adicionada em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM - Gibco, Cat 12800-017), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF - Gibco, Cat 12657-029). A linhagem 786-O, obtida do estoque de linhagens do Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental com origem do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foi cultivada em frascos de cultura de 25 cm^2 em 10 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SBF e incubada em estufa à 37 °C com atmosfera úmida em 5% de CO_2 .

Teste do MTT para citotoxicidade

Em uma placa de 96 poços foram semeadas 1×10^4 células 786-O e cultivadas por 24 horas. Em seguida, o meio foi descartado e um novo meio com os controles (positivo e negativo) e as diferentes concentrações de Naringina foram adicionados. A Doxorubicina-DOX (Sigma-Aldrich Saint Louis, USA - CAS 25316-40-9) na concentração de 18 μM foi utilizada como controle positivo; o controle negativo recebeu meio DMEM com 10% de SBF; e o tratamento com as concentrações de 5, 50, 100, 150, 200 e 250 μM de Naringina. Após 24, 48 e 72 horas de exposição, o meio foi substituído por um novo com 0,167 mg/mL de sal de MTT. Em seguida, as placas foram incubadas por 4 horas e o meio com MTT foi descartado. Após isso, foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) nos poços para a solubilização dos cristais de formazan. Ao final, a placa foi analisada pelo Labtech Microplate Reader (LT-4000) à 550 nm e a viabilidade celular foi determinada a partir da absorbância do controle ((Absorbância Tratamento / Absorbância Controle) x 100).

Teste do Cometa para genotoxicidade

Em uma placa de 6 poços, foram semeadas 1×10^6 células 786-O em meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Após 24 horas, o meio inicial foi descartado e novos com os controles (positivo e negativo) e as concentrações da Naringina foram adicionados. O controle positivo utilizado foi o Metilmetanosulfonato (MMS - Sigma-Aldrich Saint Louis, USA) na concentração de 75 μM ; o negativo com meio DMEM (10% SBF); e o tratamento com a Naringina nas concentrações de 50, 100 e 150 μM . Após 3 horas de exposição, os meios foram descartados e as células tripsinizadas (500 μL de tripsina-EDTA 0,025% à 37°C). Após esse processo, a suspensão celular deveria ter sido submetida a centrifugação (1.000 rpm) por 5 min. No entanto, por conta de problemas relacionados à falta de energia elétrica, a centrifugação não foi realizada, sendo aguardado um período de aproximadamente

3 horas para a volta da energia. Para darmos continuidade ao ensaio, utilizamos o material decantado das amostras (*pellet*).

Dessa forma, 40 μL de *pellet* foi misturado a 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LPM 0,5% à 37°C). Em seguida, o material foi depositado em lâminas pré-gelatinizadas com agarose de ponto de fusão normal (NPM 1,5% à 60°C) e as lâminas foram cobertas com lamínulas e ficaram em refrigeração por 20 min. Após isso, as lamínulas foram retiradas, e o material foi levado para uma solução de lise por 1 hora e meia em ambiente refrigerado. Posteriormente, as células foram desnaturadas por 20 min e passaram por eletroforese alcalina (25V, 300mA, 20 min.). Ao final, as lâminas foram neutralizadas, fixadas, secas e mantidas em refrigeração até a análise. Para a análise, as células foram coradas com brometo de etídeo (0,002 mg/mL) e observadas em microscopia de fluorescência (400x). No experimento, foram preparadas 3 repetições de lâminas (por tratamento) para uma análise total dos nucleoides de 300 células, no entanto, ao se observar as amostras no microscópio, constatou-se uma quantidade insuficiente de células. Esse déficit pode ser atribuído à decantação celular necessária devido à interrupção de energia previamente mencionada, resultando na falta de material e na inconclusão do teste.

Testes Estatístico

Os dados obtidos no Ensaio de Citotoxicidade (MTT) foram submetidos à análise de variância (*oneway* ANOVA), seguido do Teste de Dunnet ($\alpha=0,05$, $p<0,05$). Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Instat versão 3.02.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao ensaio de citotoxicidade, os resultados da absorbância média mostraram que as concentrações de 50 a 250 μM do tratamento com Naringina, apresentaram diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle após 24 horas. Em 48 horas, apenas a concentração de 150 μM apresentou diferença estatística em relação ao controle. Por último, em 72 horas, as concentrações de 150 a 250 μM diferiram estatisticamente do controle. De forma geral, a concentração de 150 μM mostrou ser a mais estável em relação aos outros tratamentos, mantendo seu efeito durante os três períodos testados. No caso da viabilidade celular média, nas concentrações de 150 μM (48 e 72 horas) e 250 μM (72 horas) foi observado uma viabilidade menor que 80%, uma porcentagem indicadora da citotoxicidade para as células nessas condições, considerando que a confluência indica a porcentagem de área coberta pelas células no frasco.

No caso do ensaio do cometa, ocorreram problemas com a energia e o *pellet* das amostras não apresentou material suficiente para a análise em microscopia de fluorescência. Após isso, foram feitas tentativas para o descongelamento das células 786-O armazenadas em nitrogênio, entretanto, as mesmas não se estabeleceram no cultivo e a linhagem foi perdida. Impossibilitando a investigação do potencial genotóxico da Naringina nesta linhagem.

Considerando o uso do composto em células tumorais, observa-se que a Naringina pode agir como um agente bloqueador de mediadores carcinogênicos, os quais são atuantes em sítios de iniciação de transcrição, e supressor de pró-carcinógenos, substâncias que se tornam ativas após sofrerem transformações enzimáticas. De acordo com Chen *et al.* (2016), o flavonoide mostrou-se capaz de inibir a proliferação celular e promover a apoptose em células tumorais de mama, cervical e de bexiga. No caso da linhagem 786-O, ainda não existem trabalhos mostrando o uso da Naringina e seus efeitos citotóxicos e genotóxicos, mas os dados do presente estudo mostram que este flavonoide possui potencial citotóxico frente a esta linhagem.

CONCLUSÕES

A Naringina em linhagem 786-O mostrou efeito citotóxico nos períodos de 24 horas, em concentrações de 50 a 250 μM ; em 48 horas, na concentração de 150 μM ; e 72 horas, de 150 a 250 μM . Além disso, a viabilidade celular calculada mostrou uma confluência menor que 80% nas concentrações de 150 μM (48 e 72 horas) e 250 μM (72 horas). Entretanto, o ensaio do cometa deve ser repetido, e mais estudos são necessários para que os mecanismos envolvidos no processo de citotoxicidade sejam compreendidos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq e a UEM pela bolsa e infraestrutura concedida ao projeto, a Fundação Araucária e a Capes responsáveis por outras pesquisas, e aos participantes do Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

REFERÊNCIAS

CHEN, R.; QUI, Q. L.; WANG, M. T.; LI, Q. Y. Therapeutic potential of naringin: an overview. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3203-3210, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27564838/>>. Acesso em: 10 de julho de 2023.

FANG, T.; WANG, Y.; MA, Y.; SU, W.; BAI, Y.; ZHAO, P. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats' plasma. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, p. 454- 459, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16406442/>>. Acesso em: 29 de agosto de 2023.

NARINGIN. **Pubchem**, 2005. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/naringin>>. Acesso em: 25 de agosto de 2023.