

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO COMPOSTO NATURAL NARINGINA EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Jean Marlon de Lima (PIBIC/CNPq), Myllena Borges Miguel, Michele Cristina Heck (Coorientadora), 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 e Mutagênese

Palavras-chave: Ensaio do Cometa; Ensaio do Micronúcleo; Flavonoide.

RESUMO

A naringina é um flavonoide presente, especialmente, em frutas cítricas e que apresenta potencial atividade antitumoral. Contudo, o efeito em células não-alvo é pouco investigado. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do flavonoide naringina em cultura de linfócitos humanos tratados *in vitro*. Os resultados obtidos pelo Teste do MTT demonstraram que após 48h de exposição ao flavonoide a maior concentração (250 μ M) apresentou atividade citotóxica e após 72h, exceto o tratamento com 5 μ M, todas as concentrações aumentaram a viabilidade celular. Pelo teste do Micronúcleo foi possível analisar o índice de proliferação celular com bloqueio de citocinese e os resultados indicaram não existir influência do flavonoide na proliferação celular. Além disso, os dados obtidos no Teste do Cometa e do Micronúcleo demonstraram que nenhum dos tratamentos com a naringina apresentou efeito genotóxico e mutagênico.

INTRODUÇÃO

Os flavonoides são compostos fitoquímicos que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas (Emran *et al.*, 2022). Esses compostos são especialmente abundantes em frutas como as cítricas e dentre eles se destaca a naringina, uma flavanona. Esse flavonoide possui diversas atividades farmacológicas e biológicas como antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais e por essas propriedades a naringina vem sendo bastante investigada.

Contudo, análises sobre seus potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em células não-alvo como os linfócitos são pouco explorados. É de

fundamental importância a avaliação de possíveis efeitos colaterais indesejáveis, algo que está de acordo com os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos da FDA.

Nesse contexto, estudos *in vitro* são essenciais para investigar os riscos que produtos naturais podem representar às células humanas não tumorais. Assim, os linfócitos, células responsáveis pela resposta imune, podem ser utilizados em testes como o ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-2H bromotetrazólio), que avalia o potencial citotóxico, o Teste do Cometa, que avalia a genotoxicidade por meio da detecção de lesões no DNA, e o Teste de Micronúcleo, utilizado para avaliar a mutagenicidade. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do flavonoide naringina em cultura de linfócitos humanos tratados *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Solução tratamento e Cultura de células

O flavonoide naringina CAS 10236-47-2 (Sigma®) foi dissolvido em tampão fosfato-salino (PBS). No momento do uso a solução mãe foi adicionada ao meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Gibco®) e 2% de fitohemaglutinina A, até a obtenção das concentrações de 5 a 250 μM , as quais foram definidas em trabalhos anteriores e com base na literatura.

A coleta de sangue, aprovada pelo Comitê de Ética da UEM, contou com o Termo de Consentimento Livre dos participantes. Foram coletados 40 mL de sangue periférico de três voluntários saudáveis para o Ensaio de MTT, e de um para os ensaios Cometa e Micronúcleo. Após isolar os linfócitos com Ficoll Paque Plus, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 com 20% de SBF e 2% de fitohemaglutinina A e contadas na câmara de Neubauer para os experimentos.

Teste de citotoxicidade – MTT

O ensaio foi realizado conforme Mosmann (1983), com modificações. Em placas de 96 poços foram semeados 1×10^6 linfócitos por poço. Após estabilização, foi adicionado meio completo com os tratamentos, sendo: controle, metilmetanosulfonato (MMS) [100 μM] e naringina 5, 50, 100, 150, 200 e 250 μM . Após 24, 48 e 72 horas, o meio foi trocado por 100 μL de MTT (2 mg/mL) e incubado por 4 horas. O meio foi então substituído por 100 μL de DMSO (99,7%) para solubilizar os cristais de formazan, e a leitura realizada em leitor de microplacas (Labtech) a 550 nm.

A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância (*Oneway ANOVA*), seguido do Teste de Dunnet ($\alpha=0,05$; $p<0,05$) com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5.01*.

Ensaio de genotoxicidade Cometa

O teste seguiu o protocolo de Tice *et al.* (2000), com modificações. Foram semeadas 1×10^6 células/poço em placas de 6 poços, e após 24 horas, as células foram tratadas com naringina (50, 100 e 150 μM) por 3 horas. O indutor de danos ao DNA foi o Metilmetanosulfonato (MMS) [100 μM]. Após a colheita, a suspensão foi depositada em lâminas com agarose normal, cobertas por lamínulas e refrigeradas por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de lise celular por 1:30h, submetidas a eletroforese e depois, neutralizadas, fixadas e refrigeradas até a análise. Para a análise, foram contabilizadas 100 células por lâmina, classificando-as de acordo com os danos de classes 0 a 3, excluindo as apoptóticas.

Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese

Para tanto, foi utilizado o protocolo descrito por Fenech (2000), com modificações. Após 44 horas de cultura, foi adicionada naringina (50, 100 e 150 μM) e após 48 horas, a citocalasina B (5 $\mu\text{g/mL}$) foi usada para inibir a citocinese. As células foram coletadas, fixadas em metanol-ácido acético e coradas com Giemsa a 5%. Foram analisadas 1.000 células binucleadas para a investigação da indução de micronúcleos (MN), ponte núcleo plasmática (PNP) e broto nuclear (NBUD), e 500 células para o índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) que foi calculado pela fórmula $[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/1.000$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que, pelo Teste do MTT, após a exposição de 48 horas, a concentração de 250 μM diferiu estatisticamente do controle com redução da viabilidade celular. No entanto, após 72 horas as concentrações a partir de 50 μM apresentaram diferença estatisticamente significativas em relação ao controle, com um aumento na viabilidade das células. Por meio do índice de proliferação celular com bloqueio de citocinese (CBPI) foi possível verificar que os valores obtidos para os tratamentos foram muito semelhantes aos encontrados no grupo controle. Os ensaios do Cometa e do Micronúcleo com bloqueio de citocinese demonstraram que não houve indução de lesões no DNA e nem de micronúcleos.

Segundo Memariani *et al.* (2021), a naringina suprime o crescimento de várias células cancerígenas por diferentes vias celulares, efeitos estes observados tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Por outro lado, no presente estudo não foi

observada a inibição da divisão celular em linfócitos, tampouco verificada a indução de lesões ou micronúcleos, o que também poderia ser um mecanismo de ação em relação às células tumorais. Esses achados são importantes, pois demonstram uma ação danosa em células tumorais, porém não em células saudáveis, característica fundamental para uma possível droga antitumoral. Obviamente, são necessários mais estudos, envolvendo outras células não tumorais para a confirmação desse tipo de efeito.

CONCLUSÕES

A investigação de compostos bioativos com propriedades farmacológicas e a compreensão dos mecanismos de ação é de extrema importância. Estudos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, demonstram uma possível ação antitumoral da naringina, indo de encontro com a literatura científica. Contudo, a investigação em células como linfócitos é escassa na literatura, por essa razão o presente estudo contribui com novos dados sobre a ação desse flavonóide, já que dentro das condições do presente estudo o mesmo não apresentou efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico em linfócitos. Além disso, reforçam a necessidade de investigação em outros tipos celulares que não células tumorais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo financiamento deste projeto, à Fundação Araucária, a SETI e a Capes responsável por outras pesquisas, à Universidade Estadual de Maringá, ao DBC, a minha Orientadora e aos colegas de laboratório.

REFERÊNCIAS

- EMRAN, T. B.; ISLAM, F.; NATH, N.; SUTRADHAR, H.; DAS, R.; MITRA, S.; ALSHAHRANI, M. M.; ALHASANIAH, A. H.; SHARMA, R. Naringin and naringenin polyphenols in neurological diseases: understandings from a therapeutic viewpoint. **Life**, v. 13, n. 1, p. 99, 2023.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.
- MEMARIANI, Z.; ABBAS, S. Q.; HASSAN, Q. S.; AHMADI, A.; CHABRA, A. Naringin and naringenin as anticancer agents and adjuvants in cancer combination therapy: Efficacy and molecular mechanisms of action, a comprehensive narrative review. **Pharmacological Research**, v.171, p. 105264, 2021.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.



TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Enviromental Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.