

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

Renan Felipe Moreira Soterio (PIBIC/FA), 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: Biologia Geral, Genética, Mutagênese

Palavras-chave: Flavonoide; Dihidroquercetina; Toxicogenética.

RESUMO

Este estudo avaliou o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da taxifolina em linfócitos humanos. Trata-se de um flavonoide natural encontrado em espécies vegetais como *Larix gmelinii* (larício-da-Dahúria), *Silybum marianum* (cardo-de-leite) e em frutas como cebola, maçã e uva. As células foram tratadas com concentrações de 50 a 500 μM do composto e analisadas pelos ensaios MTT, Cometa e Micronúcleo. No MTT, observou-se redução da viabilidade em 24h e aumento em 48h nas maiores concentrações testadas (450 e 500 μM). No ensaio do Cometa, apenas a concentração de 500 μM apresentou aumento de danos ao DNA, além do controle positivo. No Micronúcleo, somente o controle positivo elevou a frequência de micronúcleos e reduziu a proliferação celular. Os resultados sugerem que a taxifolina apresenta efeito tempo-dependente, com baixa citotoxicidade e ausência de efeitos mutagênicos significativos.

INTRODUÇÃO

Os flavonoides constituem uma ampla classe de metabólitos secundários presentes em plantas, reconhecidos por seus efeitos antioxidantes e protetores à saúde. Entre eles, a taxifolina, também chamada de dihidroquercetina, encontrada em espécies como *Larix gmelinii* (larício-da-Dahúria), *Silybum marianum* (cardo-de-leite) e em frutas como cebola, maçã e uva, tem sido estudada por suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Liu *et al.*, 2023).

Apesar dos potenciais benefícios relatados, é fundamental investigar possíveis efeitos adversos, especialmente em células normais como os linfócitos humanos, essenciais na resposta imunológica. Para isso, podem ser utilizados ensaios *in vitro*, como o MTT, que avalia a citotoxicidade, o Teste do Cometa, que identifica quebras no DNA, e o Teste de Micronúcleo, que detecta danos cromossômicos associados à mutagenicidade. Assim, o objetivo deste estudo foi

analisar a atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica da taxifolina em linfócitos humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Solução tratamento e cultura de células

A taxifolina (CAS 480-18-2, Sigma[®]) foi adquirida comercialmente e dissolvido em tampão fosfato-salino (PBS). A coleta de sangue, aprovada pelo Comitê de Ética da UEM (CAAE: 70612823.1.0000.0104), contou com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos participantes. Foram coletados 40 mL de sangue periférico de três voluntários saudáveis. Após isolar os linfócitos com Ficoll Paque Plus, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 com 20% de SBF e 2% de ftohemaqlutina A e contadas na câmara de Neubauer para os experimentos.

Teste de citotoxicidade – MTT

O ensaio foi conduzido conforme Mosmann (1983), com adaptações. Placas de 96 poços foram semeadas com 1×10^6 linfócitos/poço. Após estabilização, foram definidos os grupos: controle negativo, controle positivo com metilmetanosulfonato (MMS, 100 μ M) e taxifolina nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 μ M. Após 24 e 48 horas de incubação, o meio foi substituído por 100 μ L de solução de MTT (2 mg/mL), permanecendo por 4 horas. Em seguida, adicionou-se 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan e a leitura foi realizada em leitor de microplacas (550 nm).

Ensaio de genotoxicidade – Cometa

O protocolo utilizado foi o de Tice *et al.* (2000), com modificações. Uma suspensão de 1×10^6 células/mL foi tratada por 3 horas nos grupos: controle negativo, MMS (100 μ M) e taxifolina (300, 400 e 500 μ M). Após tratamento, as células foram incorporadas em agarose de baixo ponto de fusão, submetidas à lise celular, eletroforese alcalina, neutralização e fixação. As lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,002 mg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência, classificando as células em classes 0 a 3, conforme o nível de dano ao DNA, excluindo-se células apoptóticas.

Ensaio de mutagenicidade – Micronúcleo (CBMN)

De acordo com Fenech (2000), após 44 horas de cultura, os linfócitos foram separados nos grupos: controle, MMS (100 μ M) e taxifolina (300, 400 e 500 μ M). Após 48 horas, adicionou-se citocalasina B (5 μ g/mL), para bloqueio da citocinese. Em 72 horas, as células foram colhidas, fixadas em metanol/ácido acético e coradas com Giemsa a 5%. Foram analisadas 1.000 células binucleadas por tratamento para micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (NBUD),

além de 500 células para cálculo do índice de proliferação celular com bloqueio de citocinese (CBPI).

Análise estatística

Os dados obtidos no ensaio do MTT foram submetidos à análise de variância (ANOVA One-way), seguida do teste de Dunnett ($\alpha=0,05$; $p<0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism (versão 5.01).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de viabilidade celular pelo MTT mostrou que, em 24 horas, o MMS reduziu significativamente a viabilidade (41,55%), e as concentrações de 450 μM (81,38%) e 500 μM (82,52%) de taxifolina também apresentaram redução em relação ao controle. Em 48 horas, o MMS novamente reduziu a viabilidade (32,95%), enquanto as concentrações de 450 μM (145,09%) e 500 μM (166,85%) indicaram aumento da viabilidade celular, sugerindo um efeito proliferativo em doses elevadas.

No ensaio do Cometa, os resultados preliminares de um doador apontaram indução de danos apenas no controle positivo e na concentração de 500 μM , sem alterações nas demais doses. No teste do Micronúcleo, apenas o MMS elevou a frequência de micronúcleos e reduziu o índice de proliferação celular, não sendo observados efeitos mutagênicos relevantes para a taxifolina.

Estudos anteriores também descrevem seletividade da taxifolina, reduzindo danos ao DNA em células normais e apresentando citotoxicidade em células tumorais (Salehi Moghaddam *et al.*, 2023). Além disso, revisões recentes destacam seu potencial antioxidante e protetor, associado à ausência de efeitos adversos significativos em células saudáveis (Das *et al.*, 2021). Assim, os resultados obtidos neste estudo reforçam o perfil seguro da taxifolina, embora a conclusão da análise dos testes com todos os doadores seja necessária, para confirmar sua segurança de uso.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a taxifolina, em altas concentrações, reduziu a viabilidade celular em 24h, mas em 48h foi observado aumento, sugerindo que os efeitos podem variar de acordo com o tempo de exposição. Índícios de genotoxicidade foram detectados apenas na maior concentração testada (500 μM), e não foram observados efeitos mutagênicos. Esses achados apontam para uma ação tempo-dependente da taxifolina, enquanto não foram detectados efeitos mutagênicos, sugerindo baixa citotoxicidade associada à ausência de atividade mutagênica significativa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pelo financiamento deste projeto, à Universidade Estadual de Maringá, ao DBC, à minha Orientadora e aos colegas do laboratório-LMMA.

REFERÊNCIAS

DAS, A. *et al.* Pharmacological basis and new insights of taxifolin: a comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112004, 2021.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

LIU, Y. *et al.* An insight into novel therapeutic potentials of taxifolin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1173855, 2023.

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.

SALEHI MOGHADDAM, Z. *et al.* Genotoxic effects of Taxifolin on lymphocytes and MDA-MB-231 breast cancer cell line. **Spanish Journal of Environmental Mutagenesis and Genomics**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 135–136, 2023. Disponível em: <https://ojs.diffundit.com/index.php/sema/article/view/1463>. Acesso em: 2 sep. 2025.

TICE, R. R. *et al.* Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.