

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO FLAVONOIDE EPICATEQUINA EM LINFÓCITOS HUMANOS

Gabrielle Aparecida Affonso (PIBIC/CNPq), Mariane Aparecida Franco de Godoy (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: Toxicogenética; Catequina; Antioxidante.

RESUMO

Este estudo avaliou o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do flavonoide epicatequina em linfócitos humanos. As células foram tratadas com concentrações de 5 a 1.000 μM do composto e analisadas pelos ensaios MTT, Cometa e Micronúcleo. A epicatequina estimulou a viabilidade celular em curtos períodos e baixas concentrações, mas apresentou citotoxicidade após 72 h em todas as doses. Nos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, não foram observados efeitos estatisticamente significativos em relação ao controle. Os resultados mostram a importância de avaliar os compostos em diferentes doses e tempos de exposição.

INTRODUÇÃO

Os flavonoides representam um grande conjunto de metabólitos secundários, fundamentais para a biologia vegetal e para a saúde humana, e entre essas categorias, temos os flavonóis, flavanonas, flavonas, flavanóis, chalconas e isoflavonas. Dentre esses, os flavonóis, como a epicatequina, se sobressaem por suas propriedades antioxidante, hepatoprotetora, neuroprotetora e cardioprotetora (Iqbal *et al.*, 2025).

Nesse contexto, a epicatequina que é encontrada em alimentos como cacau, chá verde e uvas, tem sido pesquisada por suas propriedades antioxidantes e efeitos protetores relatados em diferentes modelos biológicos. No entanto, é necessário avaliar também se há riscos associados ao seu uso e os linfócitos, células essenciais da resposta imune, podem ser empregados nesse sentido em ensaios *in vitro*, como o MTT, que investiga o potencial citotóxico, o Teste do Cometa, que detecta quebras no DNA, e o Teste de Micronúcleo, que identifica danos cromossômicos associados à mutagenicidade. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da epicatequina em linfócitos humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Solução tratamento e Cultura de células

A epicatequina (CAS 490-46-0, Sigma®) foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em meio RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®) e 2% de fitohemaglutinina A. As concentrações utilizadas (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 e 1.000 μM) foram definidas com base na literatura. A coleta de sangue, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEM (CAAE: 70612823.1.0000.0104), foi realizada mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram obtidos 40 mL de sangue periférico de três voluntários saudáveis. Após o isolamento dos linfócitos por gradiente de densidade com Ficoll Paque Plus®, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 com 20% de SFB e 2% de fitohemaglutinina A, e contadas em câmara de Neubauer para posterior utilização nos 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 contendo os seguintes grupos: controle, controle com 0,1% de DMSO, Metilmetanosulfonato (MMS) [100 μM] e epicatequina (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 e 1.000 μM). Após 24, 48 e 72 horas de incubação, o meio foi substituído por 100 μL de MTT (2 mg/mL), com posterior incubação por 4 horas. Em seguida, adicionou-se 100 μL de DMSO (99,7%) para solubilizar os cristais de formazan, e a absorbância foi lida em leitor de microplacas (Labtech) a 550 nm.

Ensaio de genotoxicidade – Cometa

O teste seguiu o protocolo descrito por Tice et al. (2000), com modificações. Foram semeadas 1×10^6 células por poço em placas de 6 poços, e após 24 horas, as células foram tratadas com epicatequina (10, 50 e 250 μM) por 3 horas. O MMS (100 μM) foi utilizado como controle positivo. Após a colheita, 40 μL da suspensão celular foram misturados a 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão e depositados em lâminas com camada prévia de agarose normal. As lâminas foram cobertas com lamínulas e refrigeradas por 20 minutos. Em seguida, foram submetidas à lise por 1h30, seguida de eletroforese alcalina (25V, 300mA, 20 minutos), neutralização e fixação. As lâminas foram armazenadas sob refrigeração até a análise, na qual 100 células por lâmina foram classificadas em danos de classe 0 a 3, excluindo-se células apoptóticas.

Teste de Mutagenicidade – Micronúcleo

O teste foi realizado conforme Fenech (2000), com modificações. Após 44 horas do início da cultura, os linfócitos foram tratados com epicatequina (10, 50 e 250 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 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 $[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/1.000$.

As análises estatísticas dos três testes foram realizadas 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*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A epicatequina apresentou efeito dependente do tempo de exposição em culturas de linfócitos humanos. No MTT, não houve citotoxicidade em 24h, com efeito proliferativo nas concentrações a partir de 250 μM . Em 48h, apenas 5 μM diferiu do controle, mantendo uma viabilidade maior que 80%. Após 72h, todas as concentrações reduziram a viabilidade para menos de 80%, caracterizando citotoxicidade.

Estudos anteriores demonstraram efeitos citoprotetores de um análogo da epicatequina, a epigallocatequina-3-galato (EGCG-120 μM), e da vitamina D em linfócitos submetidos a estresse oxidativo por HSA glicada, com aumentos de viabilidade celular de aproximadamente 49% e 11%, respectivamente, e 60% quando combinadas, próximo ao controle positivo (aminoguanidina, 62%). É importante destacar que esses efeitos foram observados após um curto período de exposição (3 horas) (Siddiqui *et al.*, 2024). No presente trabalho, foram utilizados tempos de exposição mais prolongados (até 72 horas) e concentrações mais elevadas de epicatequina, o que pode contribuir para os efeitos citotóxicos observados. Assim, reforça a importância de considerar essas variáveis experimentais de forma criteriosa.

Nos ensaios do Cometa e Micronúcleo, foram obtidos resultados parciais com dois doadores, uma vez que o terceiro doador está sendo viabilizado. Porém, até o presente momento, em ambos os testes não foram observados efeitos significativos da epicatequina. A pesquisa realizada por Papieý (2013) investigou a ação da epicatequina e da curcumina na proteção contra danos ao DNA induzidos pelo quimioterápico etoposídeo em células da medula óssea de ratos, utilizando o teste do Cometa. Os dados obtidos revelaram que a epicatequina foi capaz de reduzir de maneira significativa os danos oxidativos ao DNA. Esses resultados indicam que a epicatequina exerce um efeito protetor antioxidante em situações de estresse oxidativo. No presente estudo, não foram detectadas alterações significativas quando comparadas ao controle, o que sugere que essa substância não apresenta ação toxicogenética em células saudáveis. Este achado é consistente com a literatura, que não aponta ação genotóxica, mas sim, seu efeito protetor envolvendo tipos celulares distintos e sob estresse oxidativo (Papieý, 2013).

CONCLUSÕES

A epicatequina apresentou efeito dependente do tempo de exposição em linfócitos humanos, estimulando a viabilidade celular em curtos períodos e baixas concentrações, mas apresentando citotoxicidade após 72h em todas as doses testadas. Até o momento da análise, não foram observados efeitos genotóxicos ou mutagênicos relevantes. Esses dados reforçam a importância de avaliar o equilíbrio entre potenciais efeitos antioxidantes e pró-oxidantes da epicatequina, considerando dose e tempo de exposição.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste projeto, à Universidade Estadual de Maringá, ao DBC, à minha Orientadora e aos colegas do laboratório-LMMA.

REFERÊNCIAS

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

IQBAL, A. *et al.* Insights into non-isoflavone flavonoid distribution and variation across soybean germplasm using HPLC-MS/MS. **LWT**, p. 118317, 2025.

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.

PAPIEŹ, M. A. The influence of curcumin and (–)-epicatechin on the genotoxicity and myelosuppression induced by etoposide in bone marrow cells of male rats. **Drug and Chemical Toxicology**, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 93–101, 2013.

SIDDIQUI, S. *et al.* Biophysical insight into the binding mechanism of epigallocatechin-3-gallate and cholecalciferol to albumin and its preventive effect against AGEs formation: An in vitro and in silico approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 267, p. 131474, 2024.

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.