



Avaliar os efeitos do produto da digestão simulada de folha de beterraba e da apigenina em células de câncer colorretal

Palavras-Chave: Câncer, Apigenina, Folha de Beterraba

AUTORES(AS):

BEATRIZ TERUI MILANEZI (FCA/UNICAMP)

DR. FERNANDO MOREIRA SIMABUCO – CO-ORIENTADOR (FCA/UNICAMP)

PROF^a DR^a ROSANGELA MARIA NEVES - ORIENTADORA (FCA/UNICAMP)

INTRODUÇÃO:

O câncer se caracteriza por ser um conjunto de doenças que possuem a proliferação celular exacerbada com principal característica. Devido à alta taxa de incidência na população mundial, a relevância para os cuidados, tratamentos e prevenções torna crucial o estímulo para que pesquisas tomem frente na compreensão dos mecanismos envolvidos na modulação de células cancerosas, bem como quais são os fatores que podem ser benéficos para a rescisão de suas atividades.

O Câncer colorretal é um dos tipos de câncer que possui maior relação com os hábitos de vida adotados pelo indivíduo ao longo da vida. Padrão alimentar, tabagismo, alcoolismo e nível de atividade física são fatores intimamente relacionados ao desfecho clínico de cada paciente (INCA, 2021).

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) é um vegetal muito consumido em todo mundo. Rica em polifenóis (moléculas naturalmente presentes em fontes vegetais), possui uma gama de propriedades notáveis à saúde humana, descritas através de estudos recentes (ROMERO et al, 2021; MANCINI et al, 2021; PONTE, 2021). Sendo a vitexina, um composto derivado da apigenina, o composto fenólico mais abundante nas folhas de beterraba.

Dentre as vias de controle do funcionamento das células, a via mTOR se destaca por sua maior ativação em células de câncer e por sua função de controlar a proliferação celular (ZOU et al, 2020). No projeto anterior, foram realizados ensaios com o produto da digestão simulada das folhas de beterraba, no qual foi verificado um efeito regulador sobre as proteínas S6 e S6K1. Um dos objetivos era avaliar o papel da vitexina nessa modulação, visto que é um dos fenólicos em maior abundância no vegetal. Entretanto, devido a intercorrências nos experimentos, não foi possível concluir as análises inicialmente desejadas, de modo que, este projeto tem como foco a investigação dos efeitos da vitexina sobre as células, bem como avaliar seus efeitos no ciclo celular em células de câncer colorretal. Neste estudo foi utilizada a apigenina por ser a molécula aglicona presente na vitexina.

METODOLOGIA:

Para esse projeto os ensaios propostos foram realizados em células de câncer colorretal da linhagem HCT116. O processo de digestão simulada da folha de beterraba liofilizada seguiu o modelo proposto por Minekus *et al.* (2014). O método utilizado para determinar a quantidade de compostos fenólicos foi o de Folin- Ciocalteu em alíquotas do material digerido da folha de beterraba.

No procedimento da viabilidade celular, foram plaqueadas duas placas de 96 poços com 1×10^4 células, avaliadas nos tempos de 24 e 48 horas. As microplacas continham as seguintes triplicatas: controle, controle DMSO 25, 50 e 100 μM , apigenina a 25, 50 e 100 μM .

Para a realização do ensaio de formação de colônia, foram plaqueadas 50 células em placa 6 well. Após 24 horas, as amostras foram tratadas com 3 mL de meio normal, no controle, 3 mL de meio contendo as quantidades de DMSO para diferentes doses de apigenina e 3 mL de meio contendo apigenina a 25, 50 e 100 μM . O tratamento foi trocado a cada 3 dias.

Em relação ao experimento de Western Blotting, utilizando o produto da digestão simulada (para as conclusões do projeto passado a respeito da proteína S6K2) e a apigenina isolada (para os demais experimentos), as células foram semeadas a uma densidade de 4×10^5 em placas de 6 poços e, no dia seguinte, tratadas com 500 ppm de material digerido por 24 horas ou 100 ppm de apigenina. As células foram lavadas com PBS $1 \times$ para coletar amostras de proteína usando um tampão de lise celular (50 mM Tris-Cl pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM ácido etilenodiaminotetracético [EDTA], 1% Triton x-100, coquetel de inibidor de protease, coquetel de inibidor de fosfatase). Os lisados foram mantidos por 15 min em gelo e centrifugados a 12.000g por 10 min. As amostras de proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE). As membranas foram incubadas (2 horas em temperatura ambiente) em leite em pó desnatado a 5% dissolvido em TBS-T (50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20) e incubados durante a noite (4°C) com anticorpos primários das proteínas das vias de interesse. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T e incubadas com anticorpos secundários contra camundongo, coelho, ou IgG de cabra conjugada com peroxidase (Amersham) diluída 1:5.000 em solução de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente três vezes com TBS-T, incubadas com o reagente SignalFire ECL (Tecnologia de Sinalização Celular) por 2 min e adquiridos no ChemiDoc Imaging System (BioRad). A densitometria de bandas foi realizada utilizando o software ImageJ v1.53 (National Institutes of Health).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No projeto anterior, foram avaliadas os efeitos do material digerido nas proteínas S6 e S6K1 através do ensaio de western blotting. Entretanto, devido à intercorrências nos experimentos, não foi possível finalizar as análises relativas à S6K2 (proteína também presente na via mTOR). Para fins conclusivos, foi realizado o novo ensaio que constatou significativa redução de expressão em relação aos controles.

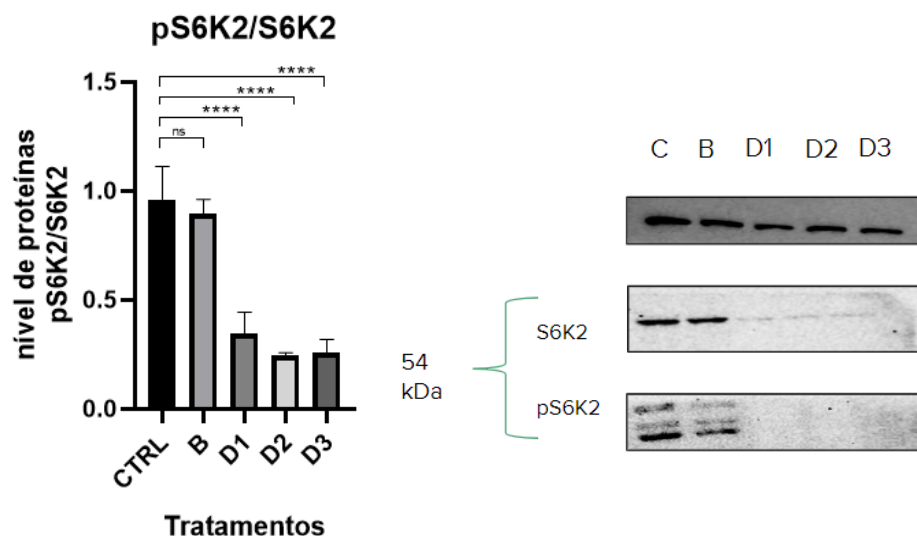


Figura 1: Nível de fosforilação da proteína S6K2 através de Western Blotting: controle (CTRL) x controle branco com as enzimas utilizadas no processo de digestão (B) x material digerido a 500 ppm (D1, D2 e D3). Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. A análise estatística foi avaliada de acordo com ANOVA seguido de teste Tukey e Dunnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). As linhas acima das barras representam a diferença estatística entre os grupos.

Para início dos experimentos com a apigenina, foi realizado um ensaio de MTT para verificar a melhor dosagem a ser utilizada nos tratamentos, ou seja, aquela que apresentasse redução de viabilidade mais significativa. A concentração escolhida foi a de 100 ppm.

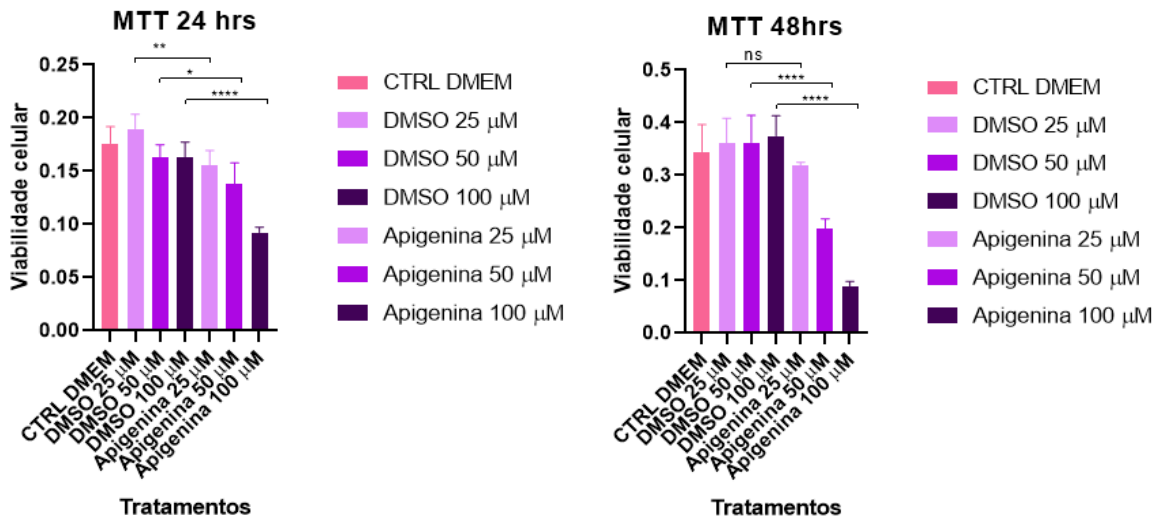


Figura 2: Ensaio de viabilidade celular (MTT): Controle x Controle DMSO x vitexina (VT) em diferentes concentrações em 24 e 48 horas, respectivamente. Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. A análise estatística foi avaliada de acordo com ANOVA seguido de teste Tukey e Dunnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). As linhas acima das barras representam a diferença estatística entre os grupos.

O experimento de formação de colônias demonstrou que a apigenina não foi capaz de reduzir o número total de colônias. Em contrapartida, a dimensão das colônias pareceu ser afetada pelo tratamento. O tratamento com apigenina aumentou de forma significativa o número de colônias menores que 0,1.

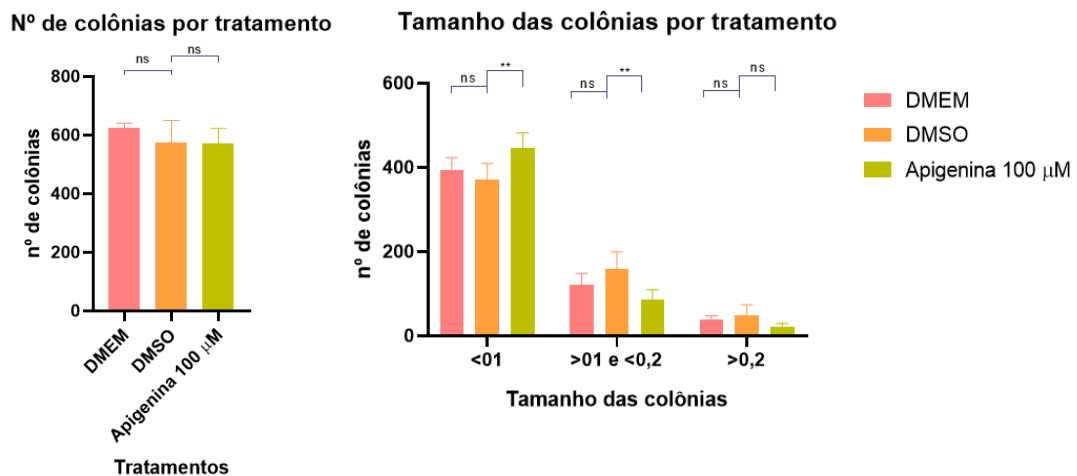


Figura 3: Ensaio de formação de colônia em amostras de controle (CTRL DMEM), controle DMSO e vitexina a 10 e 50 ppm (VT 10 e 50). Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. A análise estatística foi avaliada de acordo com ANOVA seguido de teste Tukey e Dunnet (* $p < 0,05$; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; ** $p < 0,0001$). As linhas acima das barras representam a diferença estatística entre os grupos.

Para avaliar as vias moleculares envolvidas na proliferação celular, o ensaio de western blotting foi realizado novamente, agora com a aplicação de apigenina a 100 ppm. O resultado mais significativo mostrou-se relacionado aos níveis de fosforilação da proteína S6.

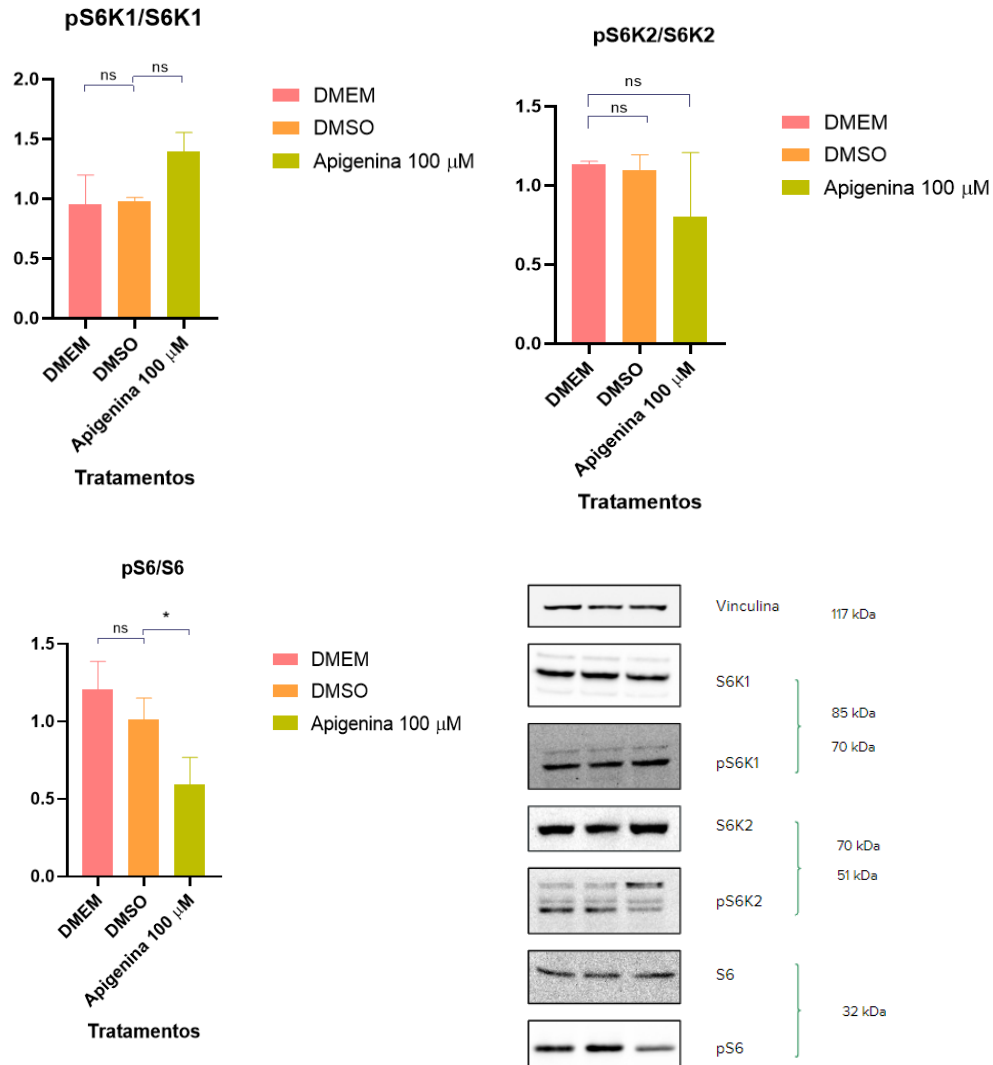


Figura 4: Nível de fosforilação das proteínas S6, S6K1 e S6K2 através de Western Blotting: controle (CTRL) x controle DMSO x apigenina 100 μ M. Os resultados são expressos em triplicata com média e \pm desvio padrão. A análise estatística foi avaliada de acordo com ANOVA seguido de teste Tukey e Dunnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). As linhas acima das barras representam a diferença estatística entre os grupos.

CONCLUSÕES:

Como conclusão geral, os resultados obtidos com o tratamento de apigenina demonstraram efeitos sobre as células de câncer colorretal quando comparadas aos controles. De acordo com o fechamento da proposta de projeto anterior, o nível de fosforilação da proteína S6K2 foi avaliado e o produto da digestão simulada de folha de beterraba demonstrou redução significativa perante os controles. Ao avaliar a ação da apigenina sobre as células, foi possível observar uma interação considerável sobre a proteína S6. O ensaio de formação de colônias não apresentou redução no número de colônias com o tratamento, entretanto, o tamanho das colônias reduziu quando comparado aos controles DMEM e DMSO. O ensaio de ciclo celular, ponto focal deste estudo, está em análise e em breve acompanhará os demais resultados.

Apesar dos resultados obtidos, mais estudos são necessários para que demais mecanismos de ação dos compostos de interesse sejam compreendidos.

BIBLIOGRAFIA

- FERLAY J, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>, acesso em: 06 fev. 2023
- INCA. Tipos de câncer > Intestino. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>. Acesso em: abr. 2020.
- MANCINI, M. C. S. et. al. Beetroot and leaf extracts present protective effects against prostate cancer cells, inhibiting cell proliferation, migration, and growth signaling pathways.
- MOSSMANN, D., Park, S. & Hall, M.N. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nat Rev Cancer* V. 18, 744–757, 2018.
- PONTE, L. G. S. Bioacessibilidade e atividade antioxidante de compostos fenólicos da folha de beterraba (*Beta vulgaris* L.). Tese (Mestrado em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo na área de Ciências Nutricionais e Metabolismo) – Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2021.
- ROMERO, S. A et. al. Anticancer effects of root and beet leaf extracts (*Beta vulgaris* L.) in cervical cancer cells (HeLa). *Phytotherapy Research*. V. 35, p. 6191–6203, 2021.
- SAEED, A., et. Al. Investigation of the tris(8-hydroxyquinoline) aluminum as a promising fluorescent optical material for in vitro bioimaging. *Optical Materials*. V. 127, 2022.
- ZOU, Z. et al. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell & Bioscience*. V. 10, n. 31, 2020.