

Análise comparativa de métodos distintos de viabilidade celular aplicados ao estudo de prospecção de produtos naturais com atividade antitumoral

Jorge Luís Santos Silva; Universidade Federal do Amazonas; jorgeluis.jl.jl92@gmail.com;

Távila Tatiane Amorim Cavalcante; Universidade Federal do Amazonas;

Italo Hugo Maciel Pimentel; Universidade Federal do Amazonas;

Carla Larissa de Souza Monteiro; Universidade Federal do Amazonas;

Ana Ligia Leandrini de Oliveira; Universidade Federal do Amazonas;

Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria; Universidade Federal do Amazonas;

1. Introdução

A avaliação da viabilidade celular é um parâmetro fundamental na pesquisa biomédica, fornecendo informações essenciais sobre o status celular em resposta a diferentes estímulos^{1,2}. A investigação do potencial antitumoral de novos produtos naturais obtidos da biodiversidade amazônica perpassa pela triagem inicial em modelos *in vitro*⁹. O ensaio MTT baseia-se na conversão do sal de tetrazólio em formazan pela ação de desidrogenases mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas^{3,4}. De forma similar, o ensaio de resazurina também avalia a atividade metabólica, mas por meio da conversão do corante em resorufina fluorescente^{5,6}. Já o ensaio de captação de vermelho neutro (VN) é fundamentado na capacidade das células vivas de incorporar e reter o corante nos lisossomos atestando a integridade da membrana lisossomal^{7,8,18}. A utilização conjunta desses métodos permite uma análise mais robusta, uma vez que, tais abordagens avaliando os diferentes mecanismos celulares podem mitigar as limitações de uma única técnica, aumentando a confiabilidade dos resultados^{1,2}.

No cenário da prospecção de produtos naturais com atividade antitumorais, destaca-se a própolis, uma substância resinosa produzida pelas abelhas com complexa composição química, rica em flavonoides e outros metabólitos secundários^{9,10,11}. Particularmente, a própolis de abelhas-sem-ferrão, cuja criação é fomentada pela meliponicultura, tem ganhado destaque por sua relevância econômica e ecológica¹¹. Apesar do conhecimento sobre a atividade citotóxica da própolis de algumas espécies contra células tumorais^{11, 12}, o potencial específico da própolis produzida pela abelha *Frieseomelitta longipes* da Amazônia permanece ainda pouco explorado, representando uma lacuna científica relevante.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo comparar, o perfil de citotoxicidade dos extratos de própolis da abelha sem ferrão *Frieseomelitta longipes* por meio de ensaios de viabilidade distintos em linhagem tumoral de pulmão.

2. Material e Métodos

O presente estudo está inserido no bioma Amazônico, com foco no município de Iranduba, no interior do Amazonas. A espécie de abelha sem ferrão, *Frieseomelitta longipes* (Smith, 1854), foi escolhida por sua ocorrência natural na região, seu potencial na produção de própolis e seu manejo por meliponicultores locais. As colônias foram mantidas em caixas padronizadas de madeira do modelo do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA), disponíveis em tamanho de 25x25 cm para ninhos maiores de 15x15 cm para os menores. As coletas foram realizadas no mês de outubro e as amostras coletadas com espátulas esterilizadas em álcool 70% e com o uso de luvas sendo armazenadas em frascos de vidro estéreis a -20 °C. A obtenção dos extratos seguiu a metodologia adaptada descrita por Bankova *et al.*¹² sendo extraída por maceração estática durante 24 horas, seguida de extração assistida por ultrassom por 30 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo a 40

°C, com purificação em cartuchos de extração em fase sólida (SPE-C18) com diferentes proporções de metanol e água. Os extratos de própolis de *Frieseomelitta longipes* (EPFL) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 200 mg/mL e armazenados em microtubos a -20 °C para uso posterior. A linhagem celular A549 (ATCC® CCL-185™), derivada de carcinoma pulmonar humano, foi mantida em frascos T75 com meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e 1% de solução de antibiótico cultivadas na estufa a 37 °C com 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de metabolização do reagente resazurina, MTT e VN e como contagem e marcação com azul de tripano. Células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço. Após 24 horas de tratamento com concentrações variando de 325 a 100 µg/mL de EPFL. Os controles positivos e negativos consistiram de células tratadas com DMSO a 20% e células não tratadas, respectivamente. No ensaio de resazurina, após 24 horas de tratamento, os poços foram lavados com solução salina 1X¹⁴ e incubados por 3 horas com meio contendo resazurina (3mM) e em seguida conduzida a leitura da absorbância em 570nm e 595nm¹⁴. Já no ensaio de de marcação lisossomal com VN, após 24 horas do tratamento e lavagem com PBS1X, as células foram incubadas com solução de meio com VN (4mg/mL) por 4 horas e realizada a absorbância a 540nm^{17, 18}. A viabilidade celular foi também avaliada utilizando o ensaio fundamentado na conversão do brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), em cristais roxos de formazano³. Assim, após tratamento e lavagem com PBS1X, as células foram incubadas com solução de MTT (5mg/mL) por 3 horas. Posteriormente, a solução foi removida e os cristais de formazano foram solubilizados com solução de isopropanol 0,04 N HCl, e realizada a leitura da placa a 595nm. Todas as etapas de leituras foram realizadas no leitor de placa laboratório de purificação de biomoléculas do CAM/UFAM. Para confirmar a morte celular induzida pelo tratamento EPFL, foi utilizado o teste de exclusão do corante azul de tripano, quantificando o número de células viáveis²⁰. Para tal, as células foram tratadas com 100 µg/mL de EPFL por 24 horas. Como controle de morte, foi utilizado Paclitaxel a 50 µM. Após esse período, as células foram isoladas por remoção enzimática com solução de Tripsina-EDTA (0,05%), e inativada com meio com SFB e após centrifugação, marcadas com solução azul de tripan (0,04%) e contadas câmara de Neubauer. Os dados obtidos foram expressos como média±erro padrão da média (SEM). Para determinar os valores de CI50, foi realizada análise de regressão não linear, e as análises estatísticas foram conduzidas com o software GraphPad Prism 9, utilizando análise de variância one-way ANOVA para avaliar a significância das diferenças entre os grupos.

3. Resultados e Discussão

O efeito citotóxico de EPFL foi avaliado por meio de três métodos de viabilidade distintos: resazurina, MTT e vermelho neutro, em duplicatas de amostras coletadas em Iranduba. Nos ensaios, observou-se que um efeito dose dependente do tratamento com EPFL na viabilidade celular (Figura 1) com similar padrão para os ensaios de MTT e resazurina. De forma distinta de tais métodos, no ensaio de VN, todas as concentrações testadas afetaram a viabilidade. Essa diferença se reflete nos valores de CI50, que foram de $219 \pm 8,23$ µg/mL para resazurina, $293,5 \pm 11,54$ µg/mL para MTT e $146,5 \pm 8,31$ µg/mL para vermelho neutro (Tabela 1, EPFL E1). Na segunda amostra de EPFL, coletada (E2), um perfil semelhante foi observado (Figura 1B). Os valores de CI50, foram de $304,6 \pm 3,04$ µg/mL para o ensaio de resazurina, $208,3 \pm 12,04$ µg/mL para MTT e $138,7 \pm 10,29$ µg/mL para VN (Tabela 1, EPFL E2).

Os ensaios de metabolização avaliados pela resazurina e MTT são indicadores da atividade mitocondrial das células^{13, 14, 15}. A resazurina, um corante indicador redox, é reduzida a resorufina pelas células metabolicamente ativas, resultando em um sinal fluorescente ou colorimétrico. O MTT, por sua vez, é um sal de tetrazólio que, ao ser clivado pelas

desidrogenases mitocondriais, forma cristais de formazano, cuja quantificação também indica a viabilidade celular. Ambos os ensaios são amplamente utilizados devido à sua facilidade de execução e sensibilidade¹⁷. Para confirmar se redução na viabilidade observada nesses ensaios estava de fato relacionada à morte celular, foi utilizado o ensaio de exclusão do corante azul de tripiano. O princípio desse ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis de excluírem o corante devido à integridade de sua membrana celular, enquanto células com membranas danificadas permitem a entrada do corante²⁰. Surpreendentemente, mesmo na concentração de 100 µg/mL, considerada não citotóxica com base nos resultados de MTT e resazurina, o EPFL induziu uma quantidade expressiva de células mortas em comparação com o controle não tratado, sendo superior ao grupo controle positivo de morte induzido pelo antineoplásico Paclitaxel.

Essa discrepância entre os ensaios pode ser explicada pelas diferentes vias de detecção da viabilidade celular. Enquanto MTT e resazurina avaliam a atividade metabólica mitocondrial, o vermelho neutro mede a capacidade das células de manter o pH lisossomal, um indicador de integridade da membrana e função celular^{16,18}. A própolis, rica em compostos bioativos como flavonoides e ácidos fenólicos, pode ter múltiplos mecanismos de ação, incluindo a indução de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial^{19, 21}. Nossos resultados sugerem que, em baixas concentrações, o EPFL pode inicialmente afetar a integridade lisossomal sem comprometer a atividade mitocondrial, levando a uma subestimação da citotoxicidade pelos ensaios de MTT e resazurina. O ensaio de azul de tripiano, ao detectar a perda de integridade da membrana, revelou o verdadeiro potencial do EPFL na viabilidade celular. Além disso, é importante considerar que a composição da própolis pode variar significativamente dependendo da origem geográfica e da espécie de abelha^{19, 22}. As diferenças observadas entre as amostras podem refletir variações na composição química do EPFL, o que poderia influenciar sua atividade biológica^{21,22}.

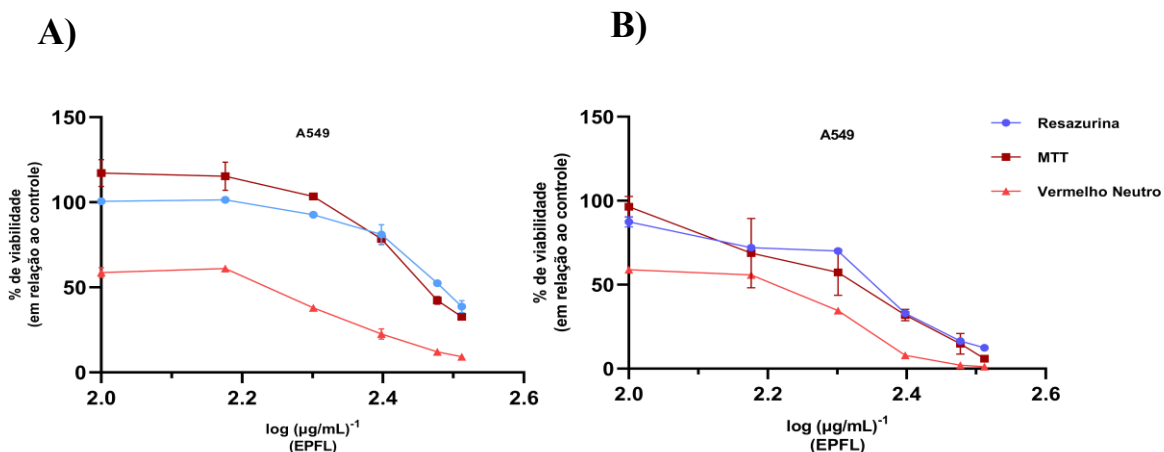


Figura 1. Curva representativa dos diferentes ensaios de viabilidade celular na linhagem A549. **A)** A549 - EPFL, primeira coleta (E1) submetidas a diferentes ensaios de viabilidade (Resazurina, MTT e Vermelho Neutro), **B)** A549 - EPFL, primeira coleta (E2) submetidas a diferentes ensaios de viabilidade (Resazurina, MTT e Vermelho Neutro). Os dados são expressos com média $\pm$ desvio padrão (N=3).

Tabela 1: Determinação dos valores de CI50 de EPASFs em A549 por diferentes métodos de ensaio de viabilidade. Extratos de duas coletas em períodos distintos. Os valores são descritos com média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Tratamento	Resazurina	MTT	Vermelho Neutro
	$\mu\text{g/mL}$		
EPFL (E1)	304,6 $\pm$ 3,04	293,5 $\pm$ 11,54	146,5 $\pm$ 8,31
EPFL (E2)	219 $\pm$ 8,23	208,3 $\pm$ 12,04	138,7 $\pm$ 10,29

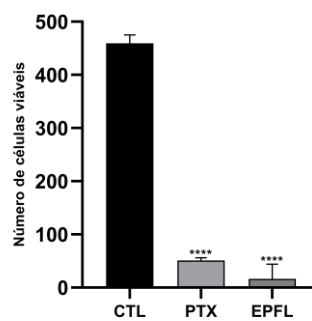


Figura 2. Ensaio de exclusão por azul de tripano em A549. As células tratadas por 24h com concentração não citotóxica de EPFL (E1) a 100 µg/mL. O tratamento com o antineoplásico PTX 50µM foi utilizado como controle de morte ****p<0,0001.

4. Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que os extratos de *Frieseomelitta longipes* (EPFL) apresenta elevada citotoxicidade conforme evidenciado pelos diferentes métodos de viabilidade *in vitro* testados. O ensaio baseado na exclusão do corante azul de tripano confirmou a morte celular observada pelo método de marcação lisossomal nas células tratadas com 100 µg/mL, concentração na qual não houve alteração na viabilidade pelos métodos baseados no metabolismo mitocondrial. Coletivamente, os resultados destacam a importância de utilizar mais de um método para mensurar a viabilidade celular, garantindo uma avaliação mais completa e precisa dos seus efeitos sobre a viabilidade celular. Nossos achados sugerem que a própolis amazônica possui potencial terapêutico e justifica investigações adicionais sobre suas propriedades antitumorais.

Palavras-Chave: ensaios de viabilidade celular, citotoxicidade *in vitro*, prospecção de produtos naturais, própolis de abelhas sem ferrão.

Agradecimentos

Agradecemos o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão das Bolsas de Estudos e a FAPEAM pelo recurso financeiro por meio do Projeto EDITAL STEM + Mulheres – Edital 08/2023 FAPEAM.

Divulgação

Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste resumo, por meio eletrônico.

Referências

1. Su J. S.; Kim, J. S.; *et al.* Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. **J Clin Lab Anal.** v. 25, p. 90-4, 2011.
2. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol.** v. 17, p. 1213-21, 201.
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v. 65, p. 55-63, 1983.

4. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD, Bhattacharya R, Dubal A, Munshi M. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb Protoc.** 2018.
5. Lavogina, Darja et al. Chemosensitivity and chemoresistance in endometriosis—differences for ectopic versus eutopic cells. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 39, n. 4, p. 556-568, 2019.
6. Petiti J, Gutbier G, Reischl B, Huppertz B, Hengsberger S. Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. **Biosensors**. v. 14, p. 156, 2024.
7. Ates G, Onder S, Borenas O, Daglioglu K, Uysal G, Yuce Z, et al. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. **Methods Mol Biol.** v. 1601, p. 19-26, 2017.
8. Rodrigues RM, Costa R, Carvalho F, Fernandes E, Bastos M. Neutral Red Uptake Assay to Assess Cytotoxicity *In Vitro*. **Methods Mol Biol.** v. 2644, p. 237-45, 2023.
9. Yen, C. T, Chen, Y. J, Chiou SH, Huang, Y. L, Wang, S. Y. Chemical composition and biological activities of propolis. **Adv Food Nutr Res.** v. 81, p. 225-63, 2017.
10. Popova M, Bankova V, Spassov S, Naydenski H, Manolova N, Ivanovska N, et al. Propolis from different regions: Chemical composition, biological activity and botanical origin. **Apidologie.** v. 52, n. 4, p. 859-76, 2021.
11. Campoccia G, Messori MR, Nicolau B, Mussi MC, de Melo FF, Trombone Carlos A, et al. Brazilian red propolis extract reduces the viability, migration, and colony formation of oral squamous carcinoma cells. **BMC Complement Med Ther.** v. 21, n. 1, p. 274, 2021.
12. Bankova, Vassya et al. Standard methods for Apis mellifera propolis research. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 2, p. 1-49, 2019.
13. VAN TONDER, Alet et al. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v. 8, 47, 20 fev. 2015.
14. Petiti, Jessica et al. Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. **Biosensors**, v. 14, n. 4, 156, 26 mar. 2024.
15. Khalef, Lefsih et al. Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments. **Cell Biochemistry and Function**, v. 42, n. 3, e4007, 2024.
16. Rodrigues, Robim M et al. "Neutral Red Uptake Assay to Assess Cytotoxicity *In Vitro*." **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)** v. 2644, p. 237-245, 2023.
17. Repetto, Guillermo et al. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-31, 2008.
18. Zhang, S Z et al. Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. **Cell Biology and Toxicology**, v. 6, n. 2, p. 219-34, 1990.
19. Waller, Stefanie B. et al. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro* activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117-121, abr. 2017.
20. Strober, Warren. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, A3.B.1-A3.B.3, 2 nov. 2015.
21. Ferreira, Sara R L et al. Healing Activity of Propolis of Stingless Bee (*Scaptotrigona aff. postica*), Reared in Monoculture of Açaí (*Euterpe oleracea*), in Induced Wounds in Rats. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 29, n. 19, 4742, 7 out. 2024.
22. Gomes, Karolina Oliveira et al. Chemical characterization and antibacterial activities of Brazilian propolis extracts from *Apis mellifera* bees and stingless bees (*Meliponini*). **PloS One**, v. 19, n. 7, e0307289, 16 jul. 2024.