

GENOTOXICIDADE ASSOCIADA AO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Cynara scolymus* L. EM CÉLULAS HUMANAS HEPG2

Ana Paula de Souza¹
Regiane Pereira da Silva²
Bianca Regina Ribas de Abreu³
Alexandre de Barros Falcão Ferraz⁴
Mauricio Lehmann⁵
Rafael Rodrigues Dihl⁶

RESUMO

A utilização de plantas para fins medicinais tem aumentado ao longo dos anos. Desta forma, a investigação de seus constituintes faz-se de extrema importância para que se possa caracterizar o risco oferecido à saúde humana. A alcachofra (*Cynara scolymus* L.) é usada como planta medicinal no tratamento de distúrbios hepáticos, controle de diarreia e diurético. O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial genotóxico do extrato aquoso das folhas de *C. scolymus* L. em células de hepatoma humano, HepG2, no ensaio cometa. Os resultados demonstraram que a alcachofra induziu aumentos significativos de danos no DNA das células nos períodos de tratamento de 1h, nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL e de 24 h, nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5,0 mg/mL. A genotoxicidade do extrato das folhas de *Cynara scolymus* L. está, provavelmente, associada aos seus componentes químicos, como os flavonóides.

Palavras-chaves: Alcachofra; extrato aquoso; genotoxicidade; teste cometa; HepG2.

ABSTRACT

The use of plants for medicinal applications has increased in recent years. Thus, the investigation of these plants' constituents is extremely important to characterize human health hazards. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) is used as a medicinal plant in the treatment of hepatic dysfunctions, diarrhea control and as diuretic. This study investigates the genotoxic potential of aqueous extract of *C. scolymus* L. leaves in the human hepatoma cell line (HepG2) using the comet assay. The results showed that artichoke extracts 2.5 and 5.0 mg/mL induced significant increases

1 Acadêmica do curso de Biomedicina/ULBRA - Bolsista PROBIC/FAPERGS

2 Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

3 Laboratório da Toxicidade Genética da ULBRA - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

4 Professor do Curso de Farmácia/Ulbra e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

5 Professor do curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

6 Professor Orientador do curso de Ciências Biológicas/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA (rafael.rodrigues@ulbra.br)

in DNA damage in cells exposed for 1 h. The same was observed in cells exposed to 1.25, 2.5 and 5.0 mg/mL for 24 h. Genotoxicity of aqueous extract of *C. scolymus* L. leaves may be associated with its chemical constituents, like flavonoids.

Keywords: Artichoke; aqueous extract; genotoxicity; comet assay; HepG2

INTRODUÇÃO

Dentre os recursos terapêuticos alternativos e de grande aceitação pela população, a utilização de plantas para uso medicinal vem crescendo junto à comunidade médica. Entretanto, devem ser utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (NOLDIN et al., 2003). Neste sentido, ainda que a utilização de plantas com propósito terapêutico seja uma prática milenar, só mais recentemente os estudos procuraram avaliar a extensão dos benefícios terapêuticos e a segurança associada ao uso de plantas medicinais (SCHWANZ et al., 2008).

A alcachofra (*Cynara scolymus* L.), pertence à família Asteraceae e é uma planta herbácea, perene, oriunda da região do Mediterrâneo e seu cultivo se dá por sementes. Apresenta folhas dispostas em roseta, longas, e do centro da planta surge uma haste floral alongada, onde são produzidas as alcachofras (ISECHI et al., 1998). As brácteas (pétalas) são suas partes comestíveis, ricas em vitaminas A e do complexo B e sais minerais como ferro, cálcio e magnésio (LOHR et al., 2009; IAPICHINO, 2013). As folhas, sob a forma de chá, tem efeito terapêutico como melhora do fluxo sanguíneo, indução da quebra de colesterol, possuindo também ação antibacteriana, antifúngica e antioxidante, além de apresentar efeito hepatoprotetor (ADZET et al., 1987; GEBHARDT, 2002; LLORACH et al., 2002).

Os ácidos fenólicos e os flavonoides são os principais componentes químicos presente nas folhas da alcachofra (NOLDIN et al., 2003) e estão associados às propriedades antioxidantes (LATTANZIO et al., 1994). A cinarina (ácido monocafeoilquinico) é o princípio ativo e age na redução da taxa de colesterol (CHO et al., 2000). Inúmeros trabalhos experimentais evidenciam as propriedades terapêuticas de *Cynara scolymus* L., porém existem poucos estudos quanto a sua atividade genotóxica tanto *in vivo* quanto *in vitro* (JACOCIUNAS et al., 2012; 2013a,b).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito genotóxico, *in vitro*, do extrato aquoso das folhas de *Cynara scolymus* L. em células de hepatoma humano, HepG2, através do Teste Cometa. Este ensaio detecta lesões genômicas, associados à quebras de fitas do DNA em células eucarióticas (TICE et al., 2000).

MATERIAIS E MÉTODOS

Extrato vegetal

As amostras de *Cynara scolymus* L. foram coletadas em uma pequena fazenda na cidade de Gramado (Rio Grande do Sul / Brasil). Após a coleta, as amostras foram

identificadas e registradas no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Luterana do Brasil (HERULBRA 4288). A partir dessas amostras foi preparado o extrato bruto aquoso das folhas (120 g) por meio de infusão (1:10 planta / solvente) com água destilada durante 30 minutos à temperatura de 80°C. A infusão foi deixada em repouso para esfriar a temperatura ambiente. Após resfriamento, o extrato foi filtrado e concentrado por liofilização durante 5 dias para se obter o extrato bruto aquoso das folhas (13,7g; rendimento: 11,4%) de *C. scolymus* L.

Cultivo celular e tratamento

As células HepG2 foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, número de catálogo 0103). As células foram cultivadas em monocamadas em frascos de cultura de 75 cm² (TPP), contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos, estreptomicina e penicilina (Gibco) a 1% e gentamicina (Gibco) a 0,1%, em uma incubadora (Thermo Scientific) a 37°C com 5% de CO₂. Para a determinação da genotoxicidade do extrato de *C. scolymus* L., dois experimentos foram realizados em duplicata. Desta forma, 1X10⁵ células foram semeadas por poço em placas de 96 poços (TPP) e incubadas durante 24 horas em meio DMEM completo, após lavou-se com DPBS (Gibco) e, em seguida as células foram tratadas com as concentrações de 0,62, 1,25, 2,5, e 5,0 mg/mL de *C. scolymus* L., além dos controles negativo (somente meio de cultura DMEM) e positivo (1,4 mM de peróxido de hidrogênio) nos períodos de 1 e 24 h. Ao final dos tratamentos, as células foram lavadas com DPBS, tripsinizadas e ressuspensas em meio completo para serem pipetadas às lâminas previamente preparadas com gel de agarose de ponto de fusão normal.

No final dos tratamentos, as células foram lavadas com DPBS a 37°C e tripsinizadas com 350 µl de tripsina (Gibco). Após 5 minutos, as células foram ressuspensas em meio completo, e 40 µL da suspensão celular foram imediatamente utilizados para o ensaio.

Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com TICE et al. (2000) com modificações. As lâminas de microscópio (Precision Glass Line) foram preparadas com uma camada de 1,5% de agarose de ponto de fusão normal (Invitrogen). Após, adicionou-se 40 µL da suspensão celular e 140 µL de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma Aldrich) a 37°C. Este material foi espalhado sobre a camada de base da lâmina, adicionada uma lâminula (Precision Glass Line) e a agarose foi submetida a solidificação a 4°C durante 5 min. Após a solidificação, a lâminula foi removida, e as lâminas foram imersas em solução de lise (89ml solução estoque, 10mL DMSO (Vetec), 1 ml de Triton X-100 (Vetec) a pH 10.0), a 4°C durante pelo menos 24h (lise das células para liberar o DNA), ao abrigo da luz. Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal imersas em uma solução alcalina (300mM NaOH (Vetec), 1 mM de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA – Nuclear), pH 13) por 20 min para o desenrolamento do DNA. A eletroforese foi

realizada em condições previamente especificadas (36V e 300mA). Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução tampão de neutralização (0,4 M Tris HCl (Invitrogen), pH 7,5) durante 15 minutos e fixadas em etanol (Nuclear) a 100%.

Análise dos resultados

As lâminas foram codificadas antes da análise microscópica, coradas com 70 µL de brometo de etídio (Sigma) e cobertas com lâminula. Os nucleóides corados foram avaliados em aumento de 400X em um microscópio de fluorescência Olympus (BX41) com filtro de excitação (515 560 nm; filtro de barreira, 590 nm). Foi avaliado, para cada tratamento, a extensão dos danos no DNA, classificando os cometas por meio de um *software* (*Comet Assay IV* - Perceptive) acoplado ao sistema de captação de imagens do microscópio. O parâmetro utilizado para a avaliação de danos foi a porcentagem de DNA na cauda (*tail intensity*). Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett para $P < 0,05$, comparando os tratamentos com o extrato de *C. scolymus* L. ao controle negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A alcachofra está entre as plantas utilizadas pela população com finalidade terapêutica, principalmente no tratamento de distúrbios hepáticos. Nesse sentido, avaliamos a ação genotóxica do extrato aquoso das folhas desta planta, *in vitro*, em células humanas HepG2, na versão alcalina do ensaio cometa. Os resultados referentes a esta avaliação estão representados nas Figuras 1 e 2. No tratamento de 1 h (Figura 1), foi observado aumento significativo na frequência de danos no DNA, representado pela porcentagem de DNA na cauda (*tail intensity*), das células expostas as duas maiores concentrações do extrato da alcachofra, 2,5 e 5,0 mg/ml, em comparação ao controle negativo (DMEM). No tratamento de 24 h (Figura 2), foram detectados aumentos significativos nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5,0 mg/ml. Somado a isso, o peróxido de hidrogênio, na dose testada de 1,4 mM, apresentou aumento significativo na indução de quebras de fitas no DNA, nos períodos de 1 e 24 h quando comparado com o controle negativo. Desta forma, os dados apontam para a ação genotóxica do extrato das folhas de *C. scolymus* L.

A aplicação da tecnologia do cultivo de células de mamíferos têm se mostrado uma ferramenta eficaz e sensível para avaliar os mecanismos pelos quais os extratos de plantas exercem suas atividades (MUNARI et al., 2010; JACOCIUNAS et al., 2013a). A linhagem celular HepG2 é uma cultura permanente oriunda de hepatoma humano. Estas células são caracterizadas pela alta capacidade de metabolização de xenobióticos, já que apresentam atividade de várias enzimas de fase I e fase II, que desenvolvem papéis importantes nos processos de ativação e detoxificação de pró-carcinógenos genotóxicos (KNASMÜLLER et al., 2004). A aplicação das células HepG2 para a avaliação da genotoxicidade e antígenotoxicidade de extratos de plantas medicinais e componentes

bioativos tem sido demonstrada na literatura (PILLAY et al., 2013; YANG et al., 2011; ANGELI et al., 2010).

Figura 1. Danos no DNA após exposição (1 h) das células HepG2 a diferentes concentrações do extrato aquoso de *C. scolymus* L. (0,62 – 5 mg/mL). CN – Controle Negativo. H2O2 – Controle Positivo (Peróxido de Hidrogênio). One-way ANOVA e teste post-hoc de Dunnett. **P < 0,01, e ***P < 0,001.

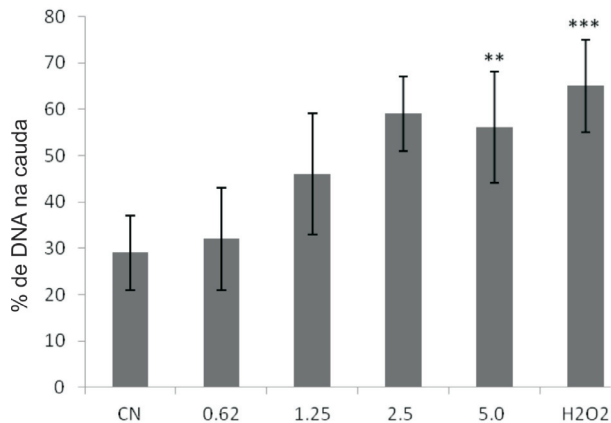
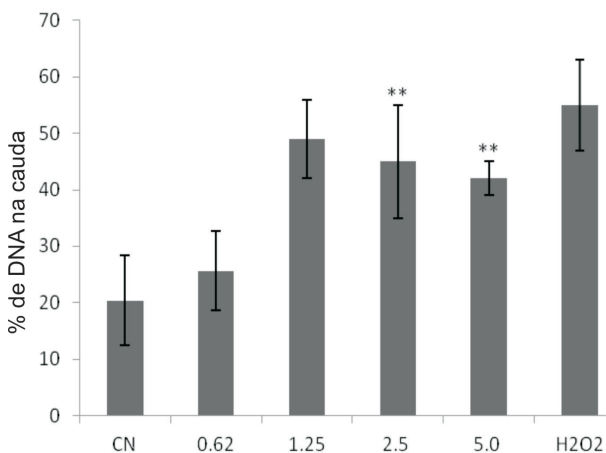


Figura 2. Danos no DNA após exposição (24 h) das células HepG2 a diferentes concentrações do extrato aquoso de *C. scolymus* L. (0,62 – 5 mg/mL). CN – Controle Negativo. H2O2 – Controle Positivo (Peróxido de Hidrogênio). One-way ANOVA e teste post-hoc de Dunnett. **P < 0,01, e ***P < 0,001.



Os resultados observados neste estudo estão de acordo com trabalhos previamente publicados na literatura, centrados na avaliação genotóxica, *in vitro*, da alcachofra. Neste sentido, JACOCIUNAS et al. (2012) avaliaram o extrato aquoso das folhas de *C. scolymus* L. no ensaio cometa, em células de ovário de hamster Chinês (CHO), e observaram aumentos significativos na indução de danos no DNA das células expostas às diferentes

concentrações do extrato. De fato, os autores detectaram aumentos na migração de DNA em todas as concentrações testadas, as mesmas utilizadas no nosso estudo, tanto no tratamento de 1 h quanto em 24 h de exposição. Por outro lado, no tratamento de 1 h as concentrações de 0,62 e 1,25 mg/mL não foram genotóxicas às células HepG2, enquanto que na exposição de 24 h, apenas a concentração de 0,62 mg/mL não promoveu aumentos na migração de DNA. Estes resultados sugerem que a presença de enzimas de metabolização na linhagem HepG2 possa ter influenciado a resposta genotóxica, quando comparado aos resultados observados em células CHO, destituídas de metabolização, conforme mencionado no estudo acima.

Adicionalmente, JACOCIUNAS et al. (2013a) observaram aumentos significativos na frequência de micronúcleos no teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN-Citoma) em células CHO, em todas as concentrações avaliadas com o extrato das folhas da alcachofra. Neste mesmo trabalho os autores demonstraram que as células expostas ao extrato durante 24 h apresentaram uma frequência de micronúcleos significativamente superior às células expostas durante o período de 1 h. Estes dados corroboram os resultados observados no presente estudo, já que a concentração de 1,25 mg/mL foi genotóxica apenas no período de 24 h de exposição. Entretanto, os autores não observaram aumentos nas frequências de broto nuclear e pontes nucleoplasmáticas das células expostas à alcachofra.

Testes *in vivo*, realizados com o extrato das folhas de alcachofra, em camundongos, no teste de micronúcleos em células do sangue periférico e em *Drosophila melanogaster*, no teste de mutação e recombinação somática (SMART) tem apontado para a ausência de genotoxicidade (ZAN et al., 2013; JACOCIUNAS et al. 2013b). Já para o teste cometa, em medula óssea de camundongos, a alcachofra mostrou-se genotóxica na concentração mais elevada 2000 mg/kg (ZAN et al., 2013).

Ainda que os mecanismos de ação genotóxica da alcachofra não tenham sido elucidados, provavelmente estão relacionados aos seus componentes ativos. A análise fitoquímica do extrato das folhas demonstrou a presença de compostos fenólicos, flavonóides e saponinas (ZAN et al., 2013). Neste sentido, os flavonóides, por sua vez, conhecidos pela sua ação antioxidante, em concentrações elevadas, também são capazes de exercer uma ação pró-oxidante, incluindo a formação de radicais (LAUGHTON et al. 1989; CAO et al. 1997).

CONCLUSÕES

Há milhares de anos os recursos da flora brasileira são utilizados pela população para o tratamento de diversas patologias. Sabe-se que muitos fitoterápicos apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas (TUROLLA et al., 2006).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o extrato das folhas de *Cynara scolymus* L. apresentou atividade genotóxica na linhagem celular HepG2, nas maiores concentrações testadas, demonstrando a importância de uma investigação preliminar dos

extratos de plantas utilizadas na medicina popular. Adicionalmente, a dose e a forma com que estes extratos são utilizados pela população necessitam de investigações científicas, sendo imprescindível a estimulação destes estudos.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

- ADZET, T.; CAMARASA, J.; LAGUNA, J. C. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds in isolated rat hepatocytes from *Cynara scolymus* against CCL4 toxicity. *Journal of Natural Products*, v. 50, p. 612-617, 1987.
- ANGELI, J. P. et al. Evaluation of the genotoxic activities of silybin in human hepatoma cells (HepG2). *Mutagenesis*, v. 25, p. 223-229, 2010.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 22, p. 749-760, 1997.
- CHO, J. Y. et al. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *European Journal of Pharmacology*, v. 398, p. 399-407, 2000.
- GEBHARDT, R. Inhibition of cholesterol biosynthesis in HepG2 cells by artichoke extracts is reinforced by glucosidase retreatment. *Phytotherapy Resources*, v.16, p. 368–372, 2002.
- IAPICHINO, G. Micropropagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L. var. *scolymus*). *Methods Molecular Biology*, v. 8, n. 29, 2013.
- ISECHI, K.; PAIVA, L. C.; MALUF, W. R. *Como plantar alcachofra*. Lavras: Grupo de Estudos de Olericultura, 1998.
- JACOCIUNAS, L. V. et al. Artichoke induces genetic toxicity and decreases ethyl methanesulfonate – Related DNA damage in Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Medicinal Food*, p. 1-6, 2012.
- JACOCIUNAS, L. V. et al. Artichoke induces genetic toxicity in the cytokinesis block micronucleus (CBMN) cytome assay. *Food and Chemical Toxicology*, v. 55, p. 56-59, 2013a.
- JACOCIUNAS, L. V. et al. Effects of *Cynara scolymus* leaf and bloom head extracts on chemically induced DNA lesions *in vivo*, in a eukaryotic model system. *Genetics and Molecular Biology*, In Press, 2013b.
- KNASMÜLLER, S. et al. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 1051-1062, 2004.
- LATTANZIO, V. et al. Browning phenomena in stored artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads: enzymic or chemical reaction? *Food Chemistry*, v. 50, p. 1-7, 1994.
- LAUGHTON, M. J. et al. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology*, v. 38, p. 28-59, 1989.

LLORACH, R. et al. Artichoke (*C. scolymus* L.) by products as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 3458– 3464, 2002.

LOHR, G.; DETERS, A.; HENSEN, A. In vitro investigations of *Cynara scolymus* L. extract on cell physiology of HepG2 liver cells. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, p. 201-208, 2009.

MUNARI, C. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology*, v. 30, p. 22-28, 2010.

NOLDIN, V. F. et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *C. scolymus* L. (Alcachofra) cultivada no Brasil. *Química Nova*, v. 26, p. 331-334, 2003.

PILLAY, P. et al. The citotoxic effects of *Scilla nervosa* (Burch.) Jessop (Hiocinthaceae) aqueous extract on culture HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 145, p. 200-204, 2013.

SCHUWANZ, M. et al. Análise de metais pesados em amostras de *Peumus boldus* Mol. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, p. 98-101, 2008.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206- 221, 2000.

TUROLLA, M. S.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 45, 2006.

YANG, G. et al. 6-gingerol prevents patulin-induced genotoxicity in HepG2 cells. *Phytotherapy Resources*, v. 25, p. 1480-1485, 2011.

ZAN, M. A. et al. *In vivogenotoxicity* evaluation of an artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extract. *Journal of Food Science*, v. 78, p. T367-T371, 2013.