

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

EFEITO IN VITRO DO EXTRATO DE CAMELLIA SINENSIS SOBRE O DNA DE LEUCÓCITOS HUMANOS¹
IN VITRO EFFECT OF CAMELLIA SINENSIS EXTRACT IN HUMAN DNA LEUKOCYTES

Daniele Scherer Drews², Ivana Beatrice Mânica Da Cruz³, Greice Franciele Feyh Dos Santos Montagner⁴

¹ Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia.

² Farmaceutica, Graduada pela Universidade Regional do Estado do Rio Grande do Sul, dany_drews@hotmail.com.

³ Doutora, Laboratório de Biogenômica, UFSM.

⁴ Doutora, DCVida, UNIJUI.

INTRODUÇÃO

Plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas pela população, justamente pelo fato de seus consumidores acreditarem que seu uso, por serem naturais, são inerentemente seguros. Este aumento do uso estaria embasado no apelo de que não haveria contraindicações, justamente por se tratar de produtos naturais (AKRAM et. al., 2014). Desta forma, a análise química detalhada de plantas medicinais é necessária para que sejam destinadas ao uso terapêutico de forma segura, pois existem vários fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabolitos secundários e suas interações com o organismo (GOBBO-NETO et. al., 2007).

Os compostos bioativos, ingeridos tanto pelo uso de plantas medicinais quanto pelos compostos presentes na dieta, desempenham um papel crucial em processos fisiológicos e no status de saúde dos indivíduos. Tal interação pode ter um impacto tanto positivo quanto negativo sobre a interação destas moléculas com o metabolismo. Neste contexto, muitas plantas têm sido estudadas para avaliar seus efeitos sobre o organismo humano. Dentro disso, podemos destacar as espécies de família Theaceae, em especial a *Camellia. sinensis*, popularmente conhecida como chá-verde (SENGER et. al., 2010, MANFREDINI et. al., 2004).

Com a identificação de compostos bioativos no chá-verde suas propriedades estão sendo descobertas, as catequinas presentes em maior quantidade nesta planta possuem várias atividades biológicas como antioxidante, anti-angiogênica, anti-proliferação do câncer, sendo relevantes para a prevenção do câncer. (COOPER et. al., 2005, THIELECKE et. al., 2009).

Apesar do potencial uso farmacológico da *C. sinensis*, estudos sobre as suas propriedades funcionais e toxicológicas ainda vem sendo realizados. Por este motivo, o objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis danos no DNA de leucócitos de indivíduos saudáveis quando expostos ao extrato de *C. sinensis*, para melhor esclarecer sua relação com o metabolismo e a prevenção da manifestação de patologias.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado em uma única etapa. O sangue foi coletado de três indivíduos por punção

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

venosa, utilizando heparina sódica como anticoagulante. Após coleta os leucócitos foram separados por centrifugação e divididos em micro tubos com igual suspensão celular (106cels/mL), em seguida foram tratados com extrato de *C. sinensis* em diferentes concentrações finais de 3µg/mL, 10µg/mL, 30µg/mL, 100µg/mL e 300µg/mL por 1h a 37C^o. Em seguida foi avaliada a viabilidade celular e os danos no DNA pelo teste cometa.

O extrato utilizado nesse estudo foi previamente preparado deixando as folhas de *C. sinensis* em contato com água destilada à 80°C por 15 minutos. Após o extrato obtido foi rotaevaporado e liofilizado e armazenado a ±4°C até o momento de uso. Para uso nos testes in vitro o extrato foi diluído em água.

As lâminas foram analisadas com o auxílio do microscópio óptico (50 células/lamina), onde cada célula foi analisada individualmente e o dano classificado visualmente de zero a quatro e a extensão da migração do DNA foi relacionada com o dano ocorrido posteriormente foi calculado o índice de danos multiplicando o número de células pela classe do dano, obtendo se assim um índice de danos de 0-200.

Os dados foram plotados em planilha eletrônica Excel e posteriormente transferidos e analisados pelo programa estatístico SPSS versão 12.0. As variáveis quantitativas foram analisadas pelos testes Student t, análise de variância One-way ou multivariada conforme o caso. Foram consideradas significativas as comparações com P<0,05.

O estudo está registrado sob o número 56972216.5.0000.5350 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (UNIJUI) sob o número 1.692.526.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *C. sinensis* é uma planta conhecida em todo o mundo e também muito utilizada na medicina tradicional, sendo a forma mais ingerida a do chá verde. Com a descoberta de diversos compostos bioativos presentes na planta o uso se torna ainda maior. Neste trabalho foi avaliado o efeito do extrato de *C. sinensis* no dano ao DNA de leucócitos utilizando o teste cometa. Foi observado que nas concentrações de 3µg/mL, 10µg/mL, 30µg/mL, 100µg/mL e 300µg/mL o extrato de *C. sinensis* comportou-se igual ao controle (Figura 1) não apresentando diferença significativa no índice de danos do DNA, o que indica que nas concentrações utilizadas o extrato não apresentou efeito genotóxico.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

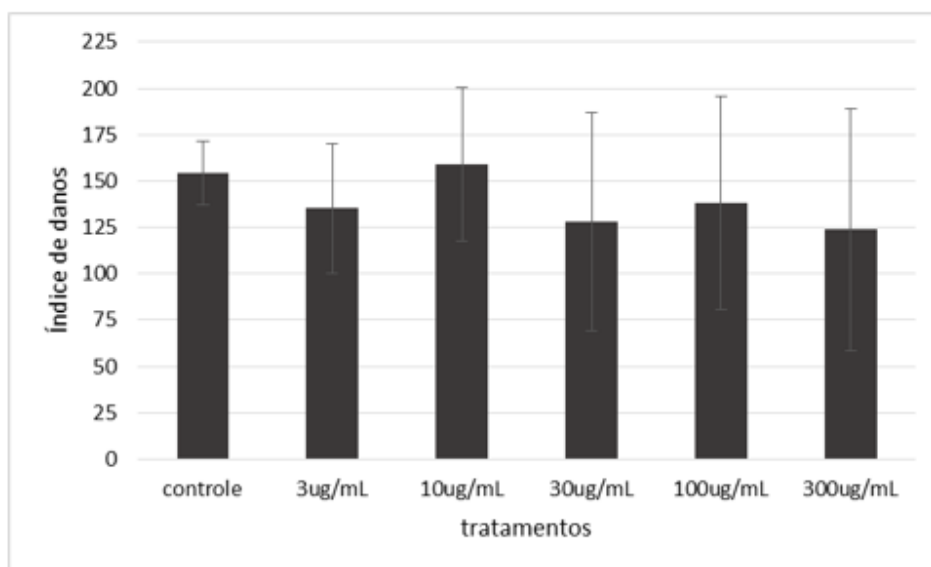


Figura 1: Avaliação do efeito genotóxico *in vitro* do extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) em leucócitos humanos.

O Ensaio do Cometa consiste em um método sensível para detectar danos no DNA, os quais acontecem através da quebra da cadeia de DNA. Este ensaio têm sido utilizado amplamente em diversos modelos experimentais, incluído testes *in vitro* ou em estudos de monitoramento em humanos para avaliar danos decorrentes de exposição à pró-oxidantes, geralmente associados ao estresse oxidativo (COLLINS, 2014, VENTURA et. al., 2013).

A instalação do estresse oxidativo se dá por meio de um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes. Sendo os fatores pró-oxidantes relacionados principalmente à exposições ambientais e hábitos de vida. Já o sistema de defesa antioxidante tem por objetivo manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo ou reduzindo danos causados pela ação deletéria de espécies reativas geradas pelo metabolismo. (BARBOSA et. al., 2010). Diante disso, a dieta, é sem dúvida, um fator de grande importância na modulação do estresse oxidativo, dada a importância de antioxidantes presentes em sua composição.

A ingestão regular de chá verde associa um menor dano ao DNA e uma maior resistência do mesmo a efeitos antioxidantes, sendo relatados estes efeitos em estudos *in vitro*. No estudo de Ho et al. (2013) linfócitos periféricos de voluntários saudáveis foram incubados em soluções de chá recém preparadas por 30 minutos a 37°C. Os efeitos genoprotetores do chá verde foram avaliados através do ensaio do cometa e observou-se que baixas doses de chá verde poderiam estar relacionadas à proteção antioxidante direta, decorrente dos polifenóis presentes em sua composição. Estudos *in vitro* com leucócitos humanos ainda não foram realizados para observar o

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

efeito genotóxico do extrato de *C.sinensis*, sendo este o único estudo com um modelo parecido ao utilizado o qual mostra que o chá verde tem proteção antioxidante na célula e o mesmo se dá pelos seus compostos bioativos.

Prasad et. al., (2015) examinou o efeito dos polifenóis de chá verde, sobre o crescimento de células de câncer de melanoma e o mecanismo molecular subjacente a esses efeitos usando diferentes linhagens celulares de melanoma humano como modelo *in vitro*, os danos no DNA foram detectados pelo ensaio do cometa. O tratamento de linhagens celulares de melanoma com polifenóis do chá verde inibiu significativamente a viabilidade celular bem como a capacidade de formação de colônias de células de melanoma de uma maneira dose dependente. O mecanismo epigenético relacionado à ação de polifenóis de chá verde pode contribuir para tanto para a quimioprevenção como para o tratamento de melanoma com a terapia epigenética.

Pode-se observar que diversos são os estudos que abordam os efeitos benéficos do chá verde, no entanto são escassos os que avaliam seus efeitos tóxicos. Desta forma, estudos como este realizado que avaliam sua citotoxicidade são importantes para a segurança e uso do chá verde em diversas terapias. Os resultados apresentados neste estudo indicam que o extrato nas condições e concentrações estudadas não apresentou efeito genotóxico, no entanto para melhor afirmar sua segurança são necessários estudos que avaliem seus efeitos tóxicos em outros modelos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos estudos *in vitro* vem sendo feitos para provar este efeito não somente no organismo humano mas também no DNA, avaliando sua toxicidade para melhor estabelecer a segurança para seu uso. Neste sentido, o presente trabalho demonstrou que o extrato de *C. sinensis* não apresentou efeito genotóxico *in vitro* em leucócitos humanos observado pelo Teste Cometa. Apesar de seu potencial farmacológico estudos sobre o chá verde ainda são bastante incipientes.

Palavra chaves: teste cometa, chá verde, genotoxicidade.

Keywords: comet assay, green tea, genotoxicity.

REFERÊNCIAS

AKRAM, M. et al. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. 2014.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo&58; conceito, implicações e fatores modulatórios Oxidative stress&58; concept, implications and modulating factors. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

COLLINS, Andrew R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 794-800, 2014.

COOPER, Raymond; MORRÉ, D. James; MORRÉ, Dorothy M. Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. **Journal of Alternative & Complementary Medicine**, v.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

11, n. 3, p. 521-528, 2005.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

HO, Cyrus K. et al. Effects of single dose and regular intake of green tea (*Camellia sinensis*) on DNA damage, DNA repair, and heme oxygenase-1 expression in a randomized controlled human supplementation study. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 6, p. 1379-1383, 2014.

MANFREDINI, Vanusa; MARTINS, Vanessa Duarte; DA SILVEIRA BENFATO, Mara. Chá verde: benefícios para a saúde humana. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 9/10, p. 68-70, 2013.

PRASAD, Ram; KATYAR, Santosh K. Polyphenols from green tea inhibit the growth of melanoma cells through inhibition of class I histone deacetylases and induction of DNA damage. **Genes & cancer**, v. 6, n. 1-2, p. 49, 2015.

SENGER, Ana Elisa Vieira; SCHWANKE, Carla HA; GOTTLIEB, Maria Gabriela Valle. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.

THIELECKE, Frank; BOSCHMANN, Michael. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome—a review. **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 11-24, 2009.

VENTURA, Lorenzo et al. Single cell gel electrophoresis (comet) assay with plants: research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. **Chemosphere**, v. 92, n. 1, p. 1-9, 2013.