

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DO ÁCIDO GÁLICO EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA C6

RAFAEL ROSA DE OLIVEIRA MORALES¹; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA²; ELIZANDRA BRAGANHOL²; ROSELIA SPANEVELLO³

¹*Acadêmico de Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas – rafaeloliveiramorales@gmail.com*

² Programa de Pós Graduação em Biociências - *Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre*

³ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - *Universidade Federal de Pelotas*

1. INTRODUÇÃO

Os gliomas são tumores que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC), derivados de células gliais e de seus precursores. Esses tumores são classificados de acordo com o grau de malignidade, características histológicas e alterações genéticas e essa classificação varia de lesões de grau I a IV, sendo a lesão de grau IV a mais agressiva (LOUIS et al., 2007).

O glioblastoma multiforme (GBM) constitui a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral, representando cerca de 50% de todas as neoplasias do SNC (HOLLAND, 2001). Considerando o prognóstico desfavorável, no qual o tempo médio de vida dos pacientes após o diagnóstico é cerca de um ano e o elevado índice de recorrência (NOVAKOVA et al., 2009; STUPP et al., 2009), a descoberta de terapias mais eficazes tornam-se extremamente importantes.

Na tentativa de encontrar novos alvos terapêuticos para o tratamento de tumores diversos compostos derivados de plantas têm sido estudados. As terapias à base de plantas podem ser alternativas promissoras por apresentarem compostos com potentes atividades biológicas. Estudos prévios tem demonstrado que o ácido gálico (AG), um composto fenólico, possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (SUBRAMANIAN et al., 2015; 2016). Sendo assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antitumoral do AG em linhagem celular de glioblastoma C6.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo da linhagem celular

A linhagem de glioblastoma multiforme de rato (C6) foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) e, foi cultivada em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37°C com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Após atingirem uma confluência de aproximadamente 90% dentro das garrafas de cultivo, as células foram tripsinizadas e posteriormente semeadas em duas placas de 96 poços (5×10^3 células/poço). As células foram mantidas na incubadora por 24h para adsorção nos poços e posteriormente expostas à concentração de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µM de ácido gálico diluído em meio DMEM durante 24, 48 e 72h. Células expostas apenas ao meio DMEM foram consideradas como controle.

2.2 Teste de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo teste do MTT. Este método consiste na medida do número de células com a mitocôndria metabolicamente ativa, baseando-se na redução do sal tetrazolium (MTT [3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) à formazan. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas à 492 nm. A absorbância é linearmente proporcional ao número de células com as mitocôndrias ativas, indicando quantas células viáveis restaram ao final do tratamento.

2.3 Teste de proliferação celular-sulfarodamina

Para a determinação da proliferação celular, após os tratamentos, as células foram lavadas e fixadas em TCA- 50% por 45 min a 4°C. Após, as células foram lavadas cinco vezes com água destilada para a retirada total do reagente e então foi adicionada a solução de sulfarodamina B 0,4% em ácido acético seguido de uma incubação de 30 min para corar as proteínas. A solução foi retirada e foram efetuadas 5 lavagens dos poços com ácido acético a 1% para total retirada do corante não complexado com as proteínas. Por fim, o corante incorporado às células foi eluído com solução de Tris (10 mM). As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm, de modo que a absorbância refletiu diretamente a quantidade de células dentro do poço.

2.5 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do post-hoc de *Bonferroni*. Os dados foram considerados significativamente diferentes do controle para um $P \leq 0,05$. Os resultados foram expressos em porcentagem de proliferação e viabilidade em relação ao grupo controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que, exceto a concentração de 50 μM de ácido gálico no tempo de 24 horas, todas as demais concentrações testadas em todos os tempos de tratamento, foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular em relação ao grupo controle ($P < 0,001$) (Figura 1). As células de glioma tratadas durante 24 horas apresentaram diminuição da viabilidade celular após exposição à 100 e 200 μM de ácido gálico (30 e 50%, respectivamente). A partir de 200 μM de ácido gálico, a redução da viabilidade celular se manteve em 50% (Figura 1).

Já no tempo de 48 horas, as células tratadas com concentrações de 100, 200, 300 e 400 μM , apresentaram redução na viabilidade celular tumoral de 70, 75, 70 e 70%, respectivamente. Cabe salientar que a concentração de 500 μM após 48 horas de exposição reduziu a viabilidade celular em 80%. As células tratadas com ácido gálico no tempo de 72 horas apresentaram resultados similares ao tempo de 48 horas (Figura 1).

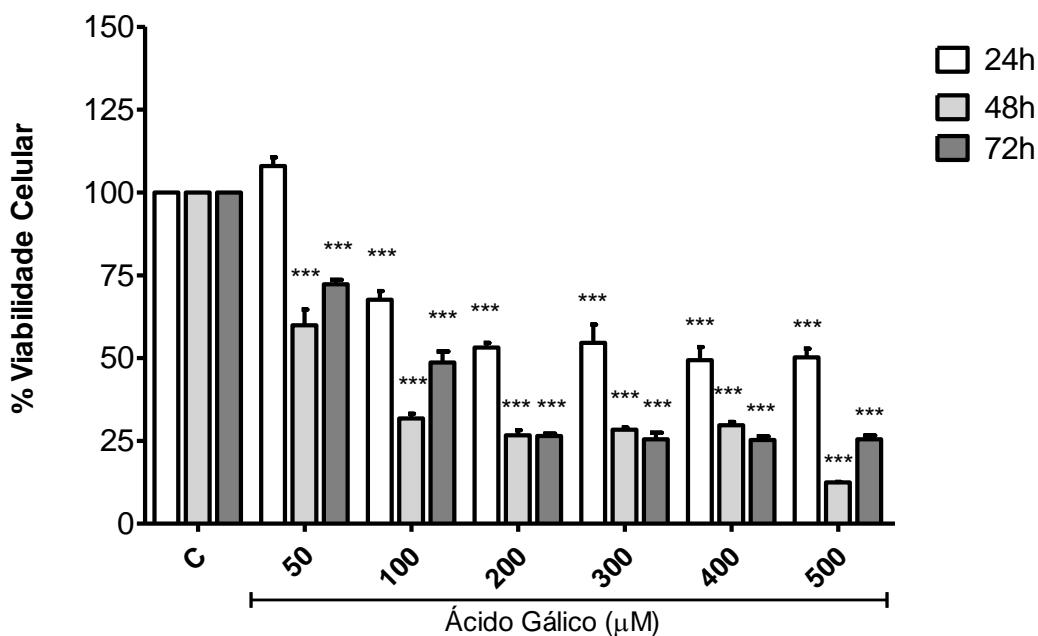


Figura 1: Porcentagem de viabilidade celular de C6 em relação ao controle após 24, 48 e 72 horas de tratamento com ácido gálico. Dados expressos como média \pm EP e analisados por ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni. *** Diferença significativa em relação ao controle para $P \leq 0,001$.

Todas as concentrações de ácido gálico usadas neste estudo apresentaram redução significativa da proliferação celular ($P < 0,01$), quando comparadas com o grupo controle (Figura 2). As células tratadas durante 24, 48 e 72 horas apresentaram diminuição da proliferação celular até a concentração de 300 μM , ponto no qual a atividade antineoplásica estabilizou em torno de 85% em comparação com os respectivos controles.

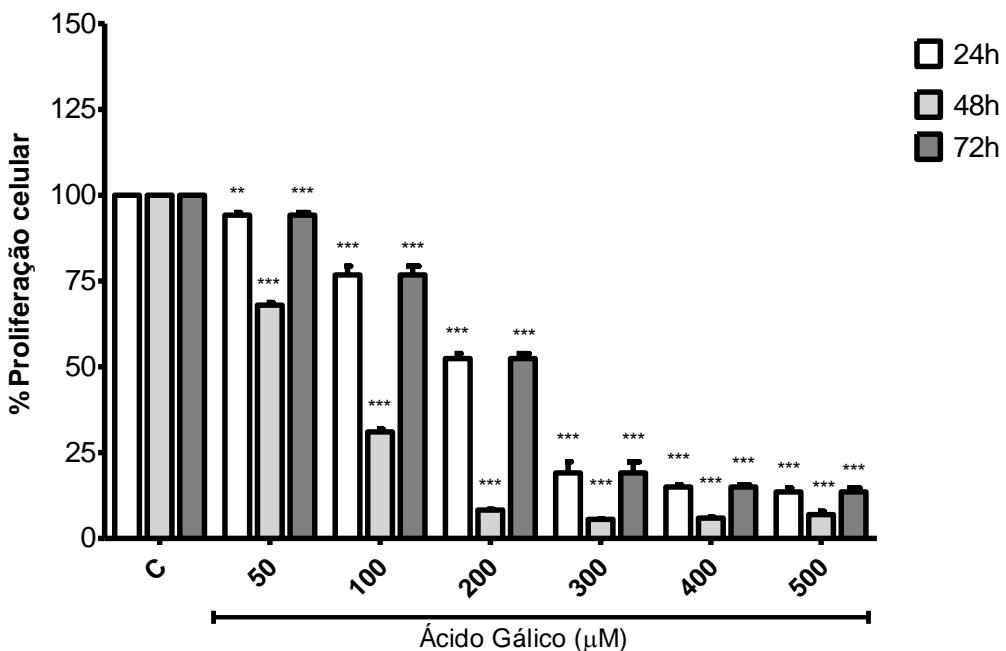


Figura 2: Porcentagem de viabilidade celular da C6 em relação ao controle após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Dados expressos como média \pm EP e analisados por ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni. ** Diferença significativa em relação ao controle para $P \leq 0,01$ *** Diferença significativa em relação ao controle para $P \leq 0,001$

Dados da literatura demonstraram que o ácido gálico também foi capaz de reduzir a viabilidade de células de câncer de colón (HCT-15) nas mesmas concentrações avaliadas neste estudo (SUBRAMANIAN et al., 2015). Além disso, dados indicam que a morte de células tumorais tratadas com ácido gálico ocorre por apoptose (SUBRAMANIAN et al., 2015). Cabe ressaltar também que o ácido gálico apresenta seletividade quanto à sua citotoxicidade, de modo, que não foi evidenciada morte celular em células não transformadas (SALUCCI et al., 2002).

4. CONCLUSÕES

Considerando que o GBM ainda não apresenta um tratamento efetivo, o efeito antitumoral apresentado pelo ácido gálico pode representar uma nova alternativa terapêutica, podendo ser utilizada em combinação com a quimioterapia padrão. Mais estudos *in vitro* e *in vivo* se mostram necessários a fim de validar a efetividade do tratamento com este composto fenólico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HOLLAND, E. C. Progenitor cells and glioma formation. **Current opinion in neurology**, v. 14, n. 6, p. 683-688, 2001.
- LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F.; CRECZYNSKI-PASA, T. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 60, p. 233-239, 2013.
- LOUIS, D. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.
- NOVAKOVA, J. et al. MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 386, n. 1, p. 1-5, 2009.
- SALUCCI, M. et al. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). **British journal of cancer**, v. 86, n. 10, p. 1645-1651, 2002.
- STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The lancet oncology**, v. 10, n. 5, p. 459-466, 2009.
- SUBRAMANIAN, A. P. et al. Gallic acid: prospects and molecular mechanisms of its anticancer activity. **RSC Advances**, v. 5, n. 45, p. 35608-35621, 2015.
- SUBRAMANIAN, A. P. et al. Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. **World Journal of Gastroenterology** v.22 n. 15, p. 3952-3961, 2016.