

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE β -CARBONILA HARMALINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE GLIOMA C6

FERNANDA GELATI SEKINE¹; NATHALIA STARK PEDRA²; NATÁLIA PONTES BONA³; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES⁴; ROSELIA SPANEVELLO⁵;
GIANA de PAULA COGNATO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – fergelati@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – natinhabona@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – giana.cognato@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A ayahuasca (AYA) é uma bebida de origem ameríndia, também conhecida como Santo-Daime, utilizada em rituais religiosos xamânicos. Essa bebida é feita a partir da cocção do cipó *Banisteriopsis caapi* e das folhas do arbusto *Psychotria viridis* sendo que nesse cipó há alcaloides β -carbolinas inibidores da enzima Monoamina Oxidase (MAO) (MCKENNA, TOWERS, ABBOT, 1984), tais como a harmina, harmalina e tetrahidroharmina as quais recebem esses nomes, pois foram identificadas pela primeira vez na planta *Peganum harmala*. Segundo SCHENBERG (2013) há nove casos de pessoas com câncer que buscaram tratamento através da AYA, e relataram algum tipo de benefício ao fazê-lo.

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo o Glioblastoma multiforme (GBM) um dos mais comuns tumores cerebrais primários. Atualmente, o tratamento consiste em cirurgia seguido de radioterapia juntamente com o quimioterápico Temodal® (BUTOWSKI et al, 2006). Apesar da existência deste tratamento, a sobrevida de pacientes acometidos por este tipo de tumor é de 12 meses (VILLODRE, 2010), sendo necessária a busca por novas modalidades terapêuticas capazes de inibir o desenvolvimento do tumor. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação preliminar dos efeitos da β -carbolina harmalina encontrada no chá da AYA em cultivo de células tumorais C6 de glioma de ratos.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo de linhagem celular

Linhagens de glioma de rato C6 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e mantidas em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Após atingirem uma confluência de 90% as células foram semeadas em uma densidade de 5×10^3 células por poço e mantidas em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂.

2.2 Cultivo primário de astrócitos

Ratos Wistar neonatos (1-2 dias), provenientes do Biotério Central da UFPel, foram utilizados para a obtenção dos astrócitos corticais, conforme descrito por GOTTFRIED (2009), os quais foram semeados em placas de 96 poços em uma densidade de 3×10^4 células por poço e mantidos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e atmosfera umidificada durante 15 dias, realizando-se trocas periódicas de meio

até serem expostos ao tratamento de interesse. É importante ressaltar que todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (5151).

2.3 Tratamento com harmalina

As células de glioma C6 foram tratadas nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 72h com a β -carbonila harmalina previamente diluída em DMSO 0,5%. Enquanto o cultivo primário de astrócito foi exposto às concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ da harmalina durante 72h. Células tratadas apenas com o veículo DMSO 0,5% foram utilizadas como controle.

2.4 Teste de citotoxicidade celular

A viabilidade celular da linhagem de glioma C6 e cultivo primário de astrócitos exposta à harmalina ou veículo foi determinada mediante o teste colorimétrico de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). O ensaio baseia-se na avaliação da atividade mitocondrial de células viáveis pela redução do sal MTT à cristais de formazan, o qual foi eluido em DMSO e os valores da absorbância foram determinados a 492 nm.

2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPadPrism 5, e analisados por ANOVA de uma via e post-hoc de Tukey. Os dados foram considerados significativos quando $P<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse trabalho os resultados mostraram uma redução significativa da viabilidade celular das células C6 do glioma de rato expostas à harmalina, sendo possível observar uma atividade citotóxica nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente em 20%, 58%, 65% e 66%, respectivamente, comparadas ao grupo controle (Figura A).

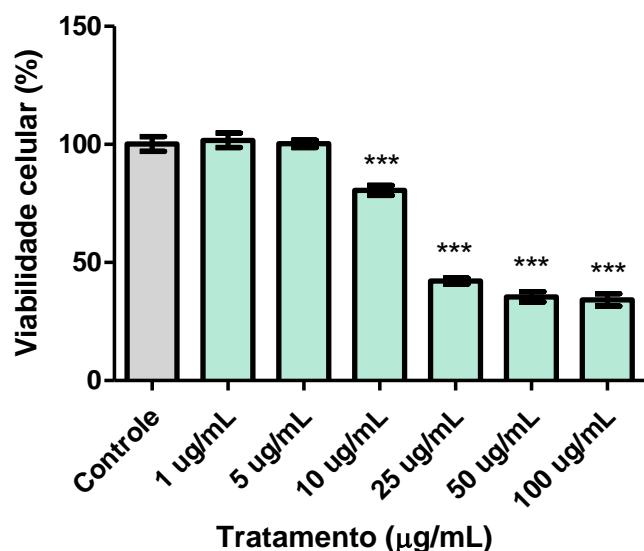


Figura A: Avaliação da atividade citotóxica de linhagem de glioma de rato C6 exposta à β -carbonila harmalina por 72h mediante teste de MTT. Dados expressos como média \pm erro padrão, analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey ($P<0,05$). ***diferença significativa quando comparado ao grupo controle DMEM ($P<0,0001$).

Além disso, ao avaliar o perfil citotóxico sobre astrócitos corticais, a viabilidade celular foi mantida quando comparada ao grupo controle, demonstrando que a harmalina não apresenta citotoxicidade contra células não transformadas (Figura B).

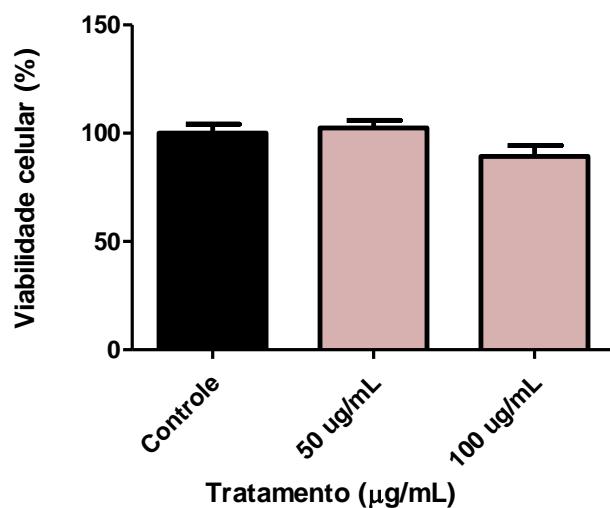


Figura B. Avaliação da atividade citotóxica de cultivo de astrócito exposto à β -carbonila harmalina por 72h mediante teste de MTT. Dados expressos como média \pm erro padrão, analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey ($P<0,05$).

Diversos estudos retratam o potencial do efeito antitumoral da harmalina. ZAKER; OODT; ARIMAND (2007), demonstraram que harmalina foi capaz de induzir morte celular em linhagem de células Leucemia promielocítica humana (HL60) de maneira dose dependente. Já JIMÉNEZ et al. (2008) evidenciaram o importante efeito citotóxico de linhagens tumorais humana de carcinoma cervical (HeLa e C33A) e carcinoma de cólon (SW480) expostas à harmalina.

Além disso, dados da literatura revelam que a harmalina é capaz de inibir a proliferação celular induzindo morte celular via apoptose sobre modelo experimental de carcinoma gástrico *in vivo* e *in vitro* (linhagem SGC-7901) (WANG et al., 2015) e linhagem de carcinoma de mama (MDA-MB-231) (SHABANI et al., 2015).

Neste contexto, os resultados do presente trabalho estão de acordo com dados da literatura que demonstram importante perfil citotóxico do alcalóide harmalina sobre células tumorais. Deste modo, considerando o arsenal terapêutico insuficiente para a terapia antiglioma, podemos inferir que a exposição *in vitro* da harmalina apresenta um efeito citotóxico seletivo para células tumorais de glioma.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram interessante perfil citotóxico da harmalina sobre células tumorais de glioma. Em contrapartida, a exposição desta β -carbonila sobre células de astrocíticas não causou citotoxicidade, revelando assim um elevado potencial terapêutico da hamalina no desenvolvimento de tratamentos clinicamente úteis contra tumores malignos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUTOWSKI N.A.; SNEED P.K.; CHANG S.M. Diagnosis and treatment of recurrent highgrade astrocytoma. **Journal of Clinical Oncology**, p.24, n.8, p. 1273-1280. 2006.
- JIMENEZ, Judith et al. Cytotoxicity of the β -carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, n. 4, p. 381-389, 2008.
- SCHENBERG, Eduardo E. Ayahuasca and cancer treatment. **SAGE open medicine**, v. 1, p. 2050312113508389, 2013.
- SHABANI, Somayeh Hashemi Sheikh et al. Peganum harmala L.'s anti-growth effect on a breast cancer cell line. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 138-143, 2015.
- SKEHAN, Philip et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- WANG, Yihai et al. Novel mechanism of harmaline on inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis by up-regulating Fas/FasL in SGC-7901 cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 18613, 2015.
- ZAKER, Farhad; OODY, Arezo; ARJMAND, Alireza. A study on the antitumoral and differentiation effects of Peganum harmala derivatives in combination with ATRA on leukaemic cells. **Archives of pharmacal research**, v. 30, n. 7, p. 844-849, 2007.