

EXTRATO DE FRUTOS DE *Eugenia uniflora* REDUZ A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Natália Pontes Bona¹; Nathalia Stark Pedra²; Mayara Sandrielly Pereira Soares³
Lorenço Torres Mendonça⁴; Elita Ferreira da Silveira⁵; Francieli Moro Stefanello⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – lorencotorres@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – elitafs24@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer é compreendido por um conjunto de diversas doenças determinadas por um crescimento desordenado de células e a sua invasão à tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, processo esse, denominado de metástase (INCA, 2016). O Glioblastoma Multiforme (GBM) representa a forma mais devastadora e comum de tumor cerebral, representando cerca de 50% de todas as neoplasias do sistema nervoso central (SNC) (HOLLAND, 2001). Pacientes acometidos apresentam uma sobrevida média de aproximadamente 14 meses após o diagnóstico (MEIR et al., 2010). É o tumor cerebral com maior incidência na população e também de maior letalidade, apresenta uma baixa capacidade de metástase, entretanto grande capacidade de infiltração através do tecido cerebral (VAN MEIR et al., 2010). Atualmente, o tratamento aplicado é a cirurgia sempre que possível, seguida de radioterapia e quimioterapia (BUTOWSKI et al., 2006).

Devido ao alto índice de mortalidade dos pacientes acometidos pelo GBM e da limitação e falta de eficiência nos tratamentos disponibilizados, há um crescente interesse em buscar por novas terapias que possibilitem uma melhora no prognóstico dos pacientes. Nesse contexto, as plantas tornam-se importantes alvos, pois são uma fonte de produtos biologicamente ativos, em razão da imensa diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas ou biológicas (SIMÕES et al., 2007). Em vista disso, os frutos do gênero *Eugenia uniflora*, popularmente conhecida como pitanga, são o foco do nosso estudo por apresentarem efeitos prévios na prevenção de alterações metabólicas, danos oxidativos, além de apresentar um papel neuroprotetor (OLIVEIRA et al., 2017).

Levando em consideração que GBM não possui terapias que levem a uma cura efetiva e que o tratamento empregado ainda permanece apenas paliativo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antitumoral in vitro do extrato de *E. uniflora* em linhagens de glioma de rato (C6) e o seu potencial citotóxico em cultura primária de astrócitos.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação do extrato

Frutos vermelhos de *E. uniflora* foram coletados, imediatamente congelados à - 20°C e mantidos ao abrigo da luz até o momento de sua utilização. Os frutos congelados foram sonicados com etanol 70°GL e o pH da solução foi ajustado para 1,0. Em seguida o extrato bruto foi filtrado, o etanol foi evaporado e

foi liofilizado até a secura total. O extrato foi preparado baseado na metodologia proposta por Bordignon e colaboradores (2009), com algumas modificações.

2.2. Cultivo de linhagem celular

A linhagem de glioma C6 foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection* - Rockville, Maryland, USA), cultivadas em meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (pH 7,4) e mantidas sob condições padrões de cultivo em incubadora a 5% de CO₂, a uma temperatura de 37°C e atmosfera umidificada. Após atingirem uma confluência de 90%, as células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 5x10³ células por poço e tratadas com o extrato de *E. uniflora* nas concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 2 mg/mL durante 48 horas. Células tratadas com DMEM 5% de SFB foram usadas como controle.

2.3. Cultivo primário de astrócitos

Para a cultura primária de astrócitos foram utilizados córtex de ratos Wistar neonatos (1-2 dias) para o isolamento das células, as quais foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (pH 7,6) e mantidas sob condições padrões de cultivo em incubadora a 5% de CO₂, a uma temperatura de 37°C e atmosfera umidificada, foram incubadas de 15-20 dias para devida maturação. As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 3x10⁴ células por poço e tratadas com o extrato de *E. uniflora*, nas concentrações de 0,5 a 2 mg/mL durante 48 horas. Células tratadas com DMEM 10% de SFB foram usadas como controle.

2.4. Citotoxicidade celular

Após a exposição do extrato de *E. uniflora* sobre a linhagem de glioma C6 e cultivo primário de astrócito, a proliferação celular e a viabilidade celular foram determinadas pelo método da Sulforodamina B e do MTT, respectivamente.

2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados em triplicata utilizando a ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É possível observar que o extrato de *E. uniflora*, no tempo de 48 h, reduziu de maneira significativa a proliferação celular em todas as concentrações avaliadas, promovendo uma inibição de 15%, 20%, 23%, 24%, 25% e 30% nas concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL respectivamente, exibindo um perfil de dose dependência (Figura 1). Além disso, nenhuma citotoxicidade sobre a cultura de astrócitos foi observada nas concentrações de 0,5 a 2 mg/mL, indicando uma seletividade de efeito e uma segurança quanto ao uso do composto (Figura 2).

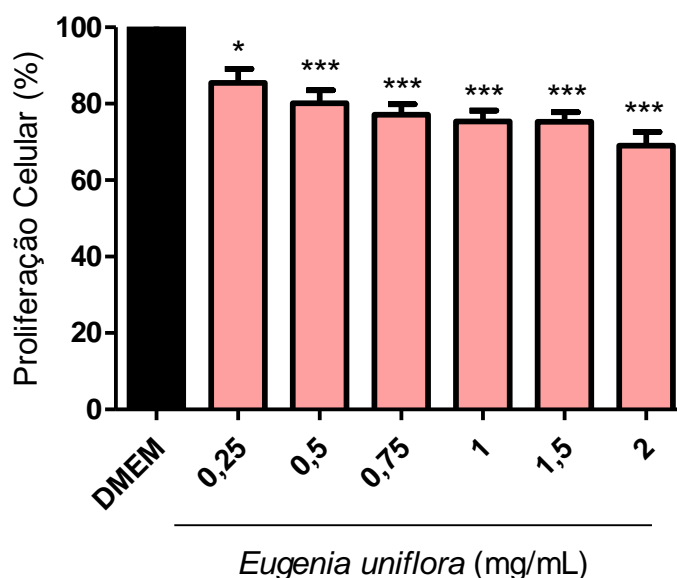


Figura 1. Atividade antitumoral do extrato de *E. uniflora* sobre linhagem de glioma C6 após 48 h de exposição. Dados expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido do *post-hoc* de Tukey. *Diferença significativa quando comparado ao controle para um $P < 0,01$.

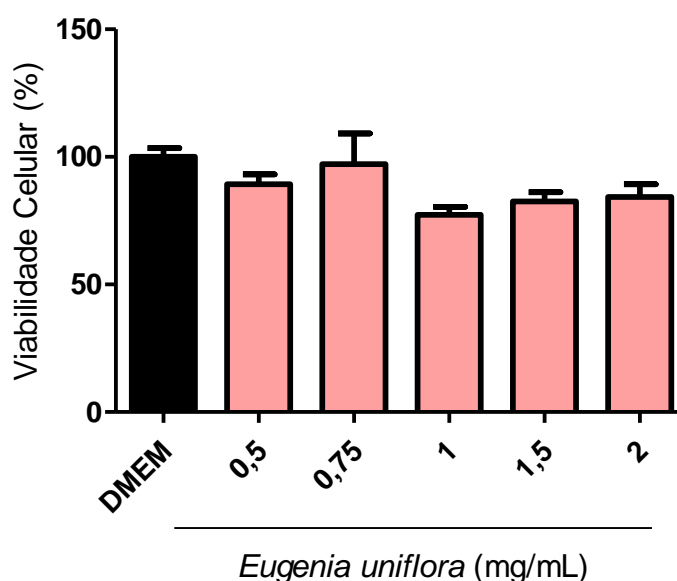


Figura 2. Atividade citotóxica do extrato de *E. uniflora* em astrócitos após 48 h de exposição. Dados expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey.

O presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito antitumoral *in vitro* do extrato de *E. uniflora* em linhagem tumoral de glioma. Nossos achados demonstraram que a pitanga apresenta uma significativa atividade antiproliferativa. A caracterização desse composto demonstrou que o extrato contém compostos fenólicos, dentre eles as antocianinas, em quantidade significativa (dados não mostrados).

Corroborando com os nossos achados, alguns estudos demonstram que os produtos derivados de plantas, principalmente os ricos em polifenóis, são capazes de inibir a geração de tumores, além de induzir a apoptose nas células cancerígenas e interferir na progressão tumoral. Além disso, acredita-se que os produtos naturais podem ser utilizados juntamente com a quimioterapia convencional para melhorar os efeitos quimiopreventivos (SHARMA et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, o extrato de *E. uniflora* apresenta uma ação antitumoral em glioma de rato (C6) promissora, não apresentando citotoxicidade em cultivo primário de astrócitos, porém mais estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos envolvidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORDIGNON JR, Celso Luiz et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183-188, 2009.

BUTOWSKI, Nicholas A.; SNEED, Patricia K.; CHANG, Susan M. Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 8, p. 1273-1280, 2006.

HOLLAND, Eric C. Progenitor cells and glioma formation. **Current Opinion in Neurology**, v. 14, n. 6, p. 683-688, 2001.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 05 de outubro de 2017.

OLIVEIRA, P. S., et al. *Eugenia uniflora* fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2017, 92: 935-941.

SHARMA, A., et al. Polyphenols in Food: Cancer Prevention and Apoptosis Induction. **Current Medicinal Chemistry**, v.24, 2017.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

VAN MEIR, E. G. et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-193, 2010.