

FUNGO ENDOFÍTICO DE *Achyrocline satureioides*: EFEITO ANTIGLIOMA SELETIVO E MODULAÇÃO DO STATUS REDOX

NATHALIA STARK PEDRA¹; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES²;
NATÁLIA PONTES BONA³; KENNIA DE CÁSSIA ARAÚJO GALDINO⁴; ELIZANDRA
BRAGANHOL⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – natinhabona@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – kenniagaldino@gmail.com

⁵Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – elizbraganhol@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Glioblastoma multiforme (GBM), um glioma de grau IV, consiste no tumor cerebral mais agressivo do sistema nervoso central, caracterizado por múltiplas alterações genéticas e danos oxidativos (RAMIREZ et al., 2013). O estresse oxidativo ocorre quando há um desbalanço entre a produção de espécies reativas, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema de defesa antioxidante, desencadeando danos celulares, necrose e conferindo características invasivas a esta neoplasia (RINALDI et al., 2016). Assim, pacientes acometidos pelo GBM exibem baixo prognóstico com sobrevida média de 15 meses (RAMIREZ et al., 2013), tornando necessária a busca por novas modalidades terapêuticas capazes de inibir o desenvolvimento do tumor e reduzindo danos oxidativos, aumentando assim, a sobrevida dos pacientes. Estudos revelam que plantas medicinais são colonizadas por fungos endofíticos, os quais são capazes de produzir metabólitos antitumorais (STROBEL; LONG, 1998; NISA et al., 2015) representando assim, uma interessante fonte de compostos bioativos. Plantas do gênero *Achyrocline* sp. exibem atividade antitumoral sobre linhagens de GBM C6 (rato), U87MG e U251MG (humano) (DE SOUZA et al., 2018). Contudo, não há estudos descrevendo se tais propriedades estão relacionadas com os metabólitos produzidos por fungos endofíticos presentes nesta planta. Neste contexto, o presente estudo visou o isolamento, análise do efeito citotóxico e parâmetros de estresse oxidativo de extrato orgânico proveniente de fungo endofítico de *Achyrocline satureioides*.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolamento e obtenção de extratos de fungo

O fungo endofítico foi isolado de caules sadios de *Achyrocline satureioides* conforme MACHADO (2009). Após, os micélios foram inoculados em meio de cultivo líquido batata-dextrose, mantidos em estufa a 25 °C e luminosidade controlada por 25 dias. Posteriormente, os compostos produzidos pelo fungo endofítico e liberados no meio de cultivo foram extraídos com o solvente orgânico acetato de etila e rotavaporado para obtenção do extrato eAcoEt.

2.2 Cultivo primário de astrócitos e linhagem de glioma

A linhagem de glioma C6 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram semeadas em uma densidade de 5×10^3 ou 3×10^6 células por poço, mantidas em estufa de CO₂, a 37 °C e atmosfera umidificada. Para realização do cultivo primário de astrócitos corticais, ratos Wistar

(1-2 dias) foram utilizados conforme DA FROTA et al. (2009). As células foram semeadas em uma densidade de 3×10^4 células por poço e mantidas em condições padrões de cultivo por 15 dias. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 4755). As culturas foram expostas ao eAcoEt nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e/ou 200 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 h. Células não tratadas foram utilizadas como controle.

2.3 Análise citotóxica

A viabilidade celular foi determinada mediante teste de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) conforme MOSMMAN (1983). O ensaio baseia-se na quantificação de células metabolicamente ativas.

2.5 Análise de parâmetros de estresse oxidativo

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (MISRA; FRIDOVICH, 1972), catalase (CAT) (AEBI, 1984) e glutathiona peroxidase (GPx) (kit comercial RANSEL®; Randox Lab, Antrim, United Kingdom), assim como os níveis intracelulares de EROs (DOS SANTOS et al., 2017) foram mensurados em células de glioma expostas ao extrato de fungo endofítico.

2.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média±erro padrão e analisados por ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $P<0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível o isolamento de um fungo endofítico o qual está em processo de identificação. O extrato eAcoEt reduziu significativamente a viabilidade celular da linhagem de glioma nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente em 24%, 55%, 73% e 80% comparado ao controle (Figura 1A). Nenhuma citotoxicidade foi observada em cultura primária de astrócitos, células não neoplásicas, sugerindo efeito antiglioma seletivo (Figura 1B). Segundo DE SOUZA et al. (2018), extrato de *A. satureioides* exibe efeito citotóxico sobre linhagem de glioma C6 em cerca de 75% na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, induzindo morte celular por apoptose. Neste sentido, pode-se inferir que o mutualismo existente entre a planta e o fungo tenha favorecido a produção de compostos com efeito antiglioma.

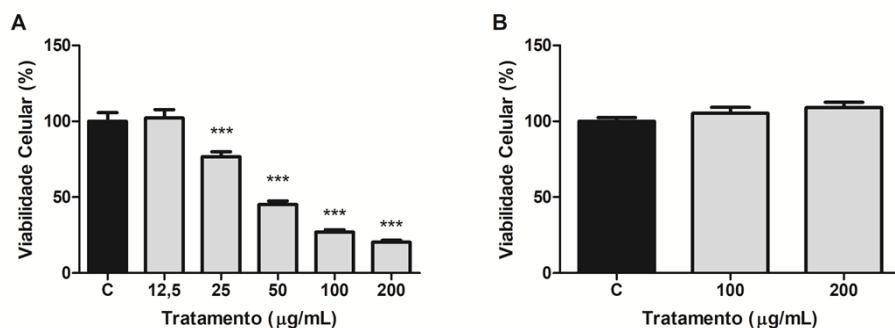


Figura 1. Análise citotóxica de células de glioma C6 (A) e cultivo primário de astrócitos (B) expostos ao eAcoEt de fungo endofítico isolado de *A. satureioides*. Após 48 h de tratamento em concentrações crescentes (12,5, 25, 50, 100 e/ou 200 $\mu\text{g/mL}$), a viabilidade celular foi determinada mediante teste de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle ('C'). Os dados foram expressos como média±erro padrão, analisados por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey e considerados significativos quando $P<0.05$. *** Significativamente diferente do controle ($P<0,0001$).

Adicionalmente, o extrato reduziu significativamente o estresse oxidativo de maneira concentração dependente. Conforme demonstrado na Figura 2A, eAcoEt (200 µg/mL) diminuiu os níveis intracelulares de EROs em 92%. Além disso, eAcoEt promoveu um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em 485%, 270% e 257%, respectivamente, na concentração de 200 µg/mL quando comparado ao controle (Figura 2B-D). De acordo com IGHODARO e AKINLOYE (2017), tais enzimas consistem na primeira linha defesa antioxidante prevenindo ou reduzindo os danos oxidativos causados pelos radicais livres. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode ser convertido à água (H_2O) e oxigênio molecular pela ação da enzima CAT, enquanto a GPx reduz o H_2O_2 à H_2O e outros peróxido lipídicos (IGHODARO; AKINLOYE, 2017). Neste contexto, sugere-se que o efeito antioxidante do extrato de fungo endofítico isolado de *A. satureioides* contribui com sua atividade antiglioma.

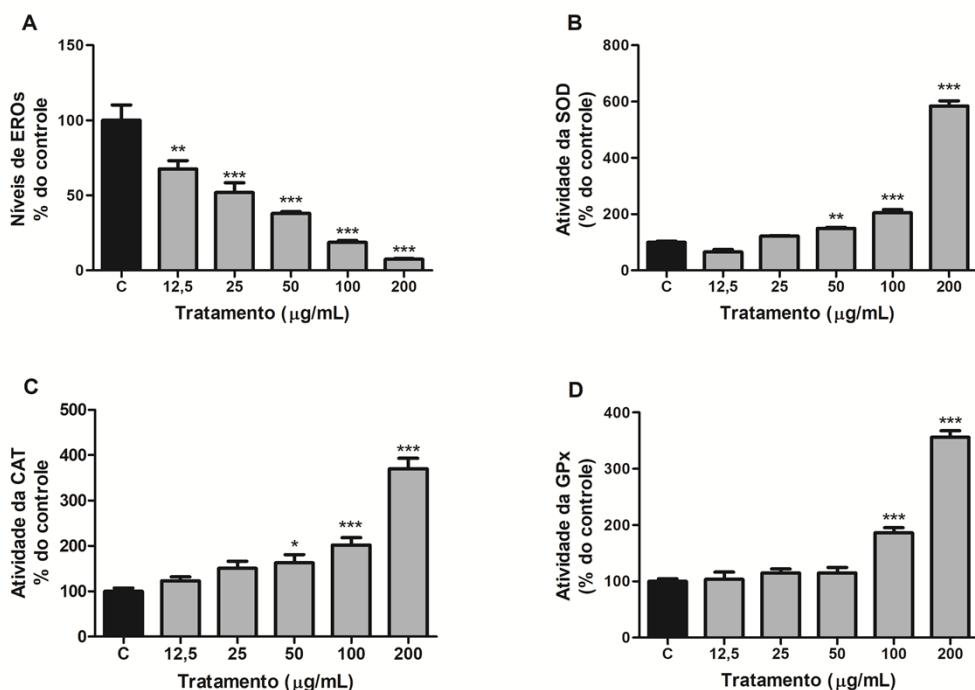


Figura 2. Extrato eAcoEt de fungo endofítico isolado de *A. satureioides* reduz parâmetros de estresse oxidativo de linhagem de glioma C6: (A) produção de EROs, (B) atividade da SOD, (C) atividade da CAT e (D) atividade da GPx. Os dados foram expressos como média±erro padrão, analisados por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey e considerados significativos quando $P<0,05$. *, **, *** Significativamente diferente do controle ('C') ($P<0,05$, $P<0,001$ e $P<0,0001$, respectivamente).

4. CONCLUSÕES

O presente estudo consiste no primeiro relato de isolamento de fungo endofítico a partir *A. satureioides*. Os metabólitos produzidos pelo fungo endofítico isolado exibiram efeito antiglioma seletivo promissor e reduziram os danos oxidativos característicos do microambiente tumoral. Os resultados indicam que os micro-organismos endofíticos representam uma fonte promissora para a busca por novos compostos com potencial antitumoral.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121–126, 1984.

DA FROTA, M. L. J.; BRAGANHOL, E.; CANEDO, A. D.; KLAMT, F.; APEL, M. A.; MOTHES, B.; LERNER, C.; BATTASTINI, A. M. O.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F. Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. *Invest. New Drugs*, v. 27, p. 13-20, 2009.

DE SOUZA, P. O.; BIANCHI, S. E.; FIGUEIRÓ, F.; HEIMFARTHA, L.; MORESCO, K. S.; GOLÇALVES, R. M.; HOPPE, J. B.; KLEIN, C. P.; SALBEGO, C. G.; GELAIN, D. P.; BASSANI, V. L.; ZANOTTO FILHO, A.; MOREIRA, C. F. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 51, p. 23-33, 2018.

DOS SANTOS, L. M.; DA SILVA, T. M.; AZAMBUJA, J. H.; RAMOS, P. T.; OLIVEIRA, P. S.; SILVEIRA, E. F.; PEDRA, N. S.; GALDINO, K.; DO COUTO, C. A. T.; SOARES, M. S. P.; TAVARES, R. G.; SPANEVELLO, R. M.; STEFANELLO, F. M.; BRAGANHOL, E. Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 424, n. 1-2, p. 69-78, 2017.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Alexandria Journal of Medicine*, p. 1-7, 2017.

MACHADO, M. A. B. L. *Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de Caesalpinia echinata Lam. (Leguminosae-Caesalpinoideae)*. 2009. 144 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological of Chemistry*, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOON, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis*, v. 82, p. 50-59, 2015.

RAMIREZ, Y. P.; WEATHERBEE, J. L.; WHEELHOUSE, R. T.; ROSS, A. H. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1475-1506, 2013.

RINALDI, M.; CAFFO, M.; MINUTOLI, L.; MARINI, H.; ABBRITTI, R. V.; SQUADRITO, F.; TRICHILO, V.; VALENTINI, A.; BARRESI, V.; ALTAVILLA, D.; PASSALACQUA, M.; CARUSO, G. ROS and brain gliomas: an overview of potential and innovative therapeutic strategies. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 6, p. 984, 2016.

STROBEL, G. A.; LONG, D.M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *ASM News*, v. 64, n. 5, p. 263-268, 1998.