

Ácido tânico: um importante agente terapêutico em linhagem de glioblastoma multiforme (C6)

NATÁLIA PONTES BONA¹; NATHALIA STARK PEDRA²; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA³; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES⁴; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas –nataliapbona@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas –nathaliastark@hotmail.com

³Universidade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – julianahazambuja@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os gliomas são o tipo mais comum de tumor do sistema nervoso central (SNC), representando cerca de 80% de todos os tumores malignos primários do cérebro (MESSALI et al., 2014). O glioblastoma multiforme (GBM) é um astrocitoma primário de maior malignidade e que apresenta uma frequente recorrência. Além disso, é responsável por mais de 60% de todos os tumores cerebrais em adultos (ROCK et al., 2014). Apesar da diversidade das terapias atuais, o GBM ainda permanece sendo uma doença sem cura e com um mau prognóstico. Os pacientes acometidos por essa doença apresentam uma sobrevida de aproximadamente 14 meses após o diagnóstico (THAKKAR et al., 2014).

Tendo em vista o alto índice de mortalidade que apresentam os pacientes acometidos pelo GBM e os problemas decorrentes dos tratamentos disponibilizados, há um constante interesse em se buscar alternativas terapêuticas com o objetivo de conceder ao paciente uma melhora na qualidade de vida. Com isso, o ácido tânico (AT) é considerado um importante alvo, em consequência de suas propriedades medicinais já descritas na literatura, como efeitos anticancerígenos, onde atua no controle da proliferação e indução da apoptose celular (CHEN et al., 2009).

Considerando o exposto, a finalidade desse trabalho foi avaliar o efeito antitumoral *in vitro* do AT em linhagem de glioma de rato (C6), a capacidade de migração celular e o potencial citotóxico em cultura primária de astrócitos.

2. METODOLOGIA

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 AT nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 37,5; 50; 75 µM durante 24 e 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 AT, nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 37,5; 50; 75 µM durante 48 horas. Células tratadas com DMEM 10% de SFB foram usadas como controle. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

2.4. Citotoxicidade celular

Após a exposição do AT tânico sobre a linhagem de glioma C6 e cultivo primário de astrócito, a proliferação celular foi determinada pelo método da Sulforodamina B.

2.5. Migração celular

As células foram semeadas em placas de 12 poços e expostas ao tratamento a uma concentração de 6,25 por um tempo de 48 h. Após foi criada uma lesão na monocamada de células (parte inferior da placa) com o auxílio de uma ponteira, os poços foram lavados e foi adicionado DMEM sem tratamento. O fechamento da lesão foi monitorado com o auxílio de microfotografias nos tempos de 0, 6, 12 e 24 h. A análise quantitativa da área livre de células foi realizada através do software ImageJ, e após foi determinada a porcentagem de inibição da migração celular.

2.5. Análise estatística

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram uma redução significativa na proliferação celular dependente da concentração e do tempo. No tempo de 24 h de exposição ao tratamento com AT, houve uma redução média de 23,3% (Figura 1A). Já no tempo de 48 h de exposição ao tratamento com AT houve uma redução média de 38,1% (Figura 1B). Além disso, o AT demonstrou uma atividade seletiva frente à sua ação nas células tumorais, uma vez que não teve efeito sobre a proliferação no cultivo primário de astrócitos (Figura 1C). Já no teste de migração celular, foi possível observar que no tempo de 24 h houve um fechamento da lesão de 53% no grupo controle e que o AT inibiu essa migração celular em 81% (Figura 2).

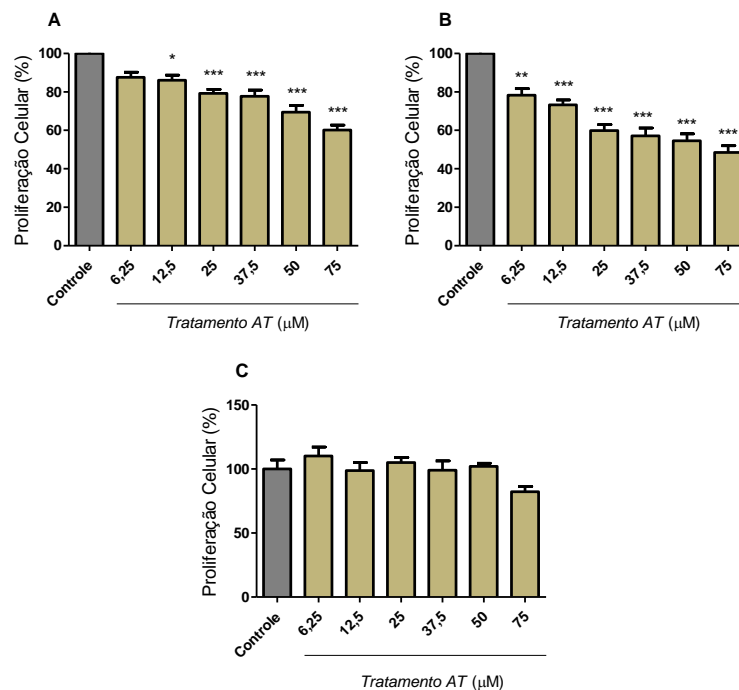


Figura 1. Avaliação citotóxica do ácido tânico (AT) na proliferação celular em linhagem tumoral de glioblastoma multiforme (C6) (A e B) e cultivo primário de astrócitos (C), no tempo de 24 e 48 h. Valores expressos em média \pm erro padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido de *post-hoc* de Tukey. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

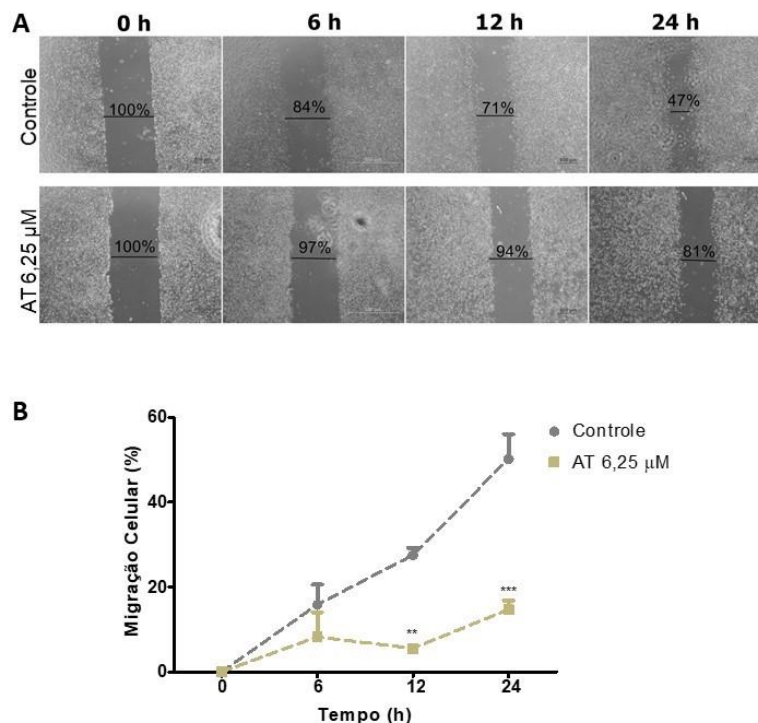


Figura 2. Microfotografias representativas da migração de células de GBM (C6) no tempo de 0, 6, 12 e 24 h (A). A porcentagem da migração de células de GBM (C6) após a exposição ao tratamento e tempos diferentes foi analisada por ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* de Bonferroni (B). ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

4. CONCLUSÕES

Concluindo, o AT apresentou um efeito citotóxico promissor frente a células de GBM (C6), não demonstrando citotoxicidade em cultivo primário de astrócitos. Além disso, o tratamento inibiu significativamente a migração das células tumorais. Assim, o AT exibe propriedades terapêuticas importantes, sendo um potencial agente para o tratamento do GBM. Porém mais estudos são necessários, para melhor elucidar o seu mecanismo de ação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, Kuo-Shuen et al. Tannic acid-induced apoptosis and-enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. **Leukemia research**, v. 33, n. 2, p. 297-307, 2009.

MESSALI, Andrew; VILLACORTA, Reginald; HAY, Joel W. A review of the economic burden of glioblastoma and the cost effectiveness of pharmacologic treatments. **Pharmacoeconomics**, v. 32, n. 12, p. 1201-1212, 2014.

ROCK, K. et al. A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme—the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival?. **The British journal of radiology**, v. 85, n. 1017, p. e729-e733, 2012.

THAKKAR, Jigisha P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, 2014.