

## ÁCIDO TÂNICO COMO UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA PARA O GLIOBLASTOMA: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

NATÁLIA PONTES BONA<sup>1</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>2</sup>; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA<sup>3</sup>; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>4</sup>; LUIZA SPOHR<sup>5</sup>; FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas –nataliapbona@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas –nathaliastark@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – julianahazambuja@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@hotmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O Glioblastoma (GB) é um tipo de tumor cerebral primário, extremamente agressivo e sem cura. O tratamento atual para o GB é multimodal compreendendo uma ressecção cirúrgica sempre que plausível, seguido de radioterapia e quimioterapia com o fármaco padrão temozolomida (TMZ) (LOUIS et al., 2016). A problemática associada a ressecção cirúrgica se dá devido a impossibilidade de remoção completa do tumor sem que se prejudique a função cerebral do paciente, em consequência do GB ser altamente invasivo, resultando em recorrência do tumor e óbito do paciente (GIESE et al., 2003). Já na quimioterapia com o TMZ, é possível observar um aumento de sobrevida global média dos pacientes em aproximadamente 2 meses (WILSON et al., 2014). Mesmo que atualmente se tenha uma ampla diversidade de terapias, o GB permanece sendo uma doença sem cura e que apresenta um mau prognóstico (THAKKAR et al., 2014).

Considerando que pacientes acometidos por GB apresentam um alto índice de mortalidade e que o tratamento ainda é uma grande problemática, cresce o interesse em se estudar alternativas terapêuticas com o intuito de conceder uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes com GB. Com isso, os produtos naturais têm se apresentado como importantes alvos para o tratamento de diversas patologias, dentre eles, o ácido tânico que apresenta atividade antitumoral e efeitos bem comprovados em doenças que acometem o Sistema Nervoso Central (CHEN et al., 2009; SEM et al., 2015).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antiglioma *in vitro* e *in vivo* do ácido tânico (AT).

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. Animais

Para o cultivo primário de astrócitos, foram utilizados 6 ratos Wistar, de 1 a 3 dias de idade e foram realizados três experimentos independentes. Para o modelo *in vivo* de glioma, foram utilizados 20 ratos Wistar machos com 60 dias de idade (250-300g). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da instituição, sob o número de protocolo CEEA 31292-2018.

## 2.2. Cultivo primário de astrócitos

Foram utilizados córtex de ratos neonatos para separação das células. O cultivo foi mantido em meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em condições padrões de cultivo celular. As células foram incubadas por 15 dias, de modo a atingirem a maturação necessária. As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $3 \times 10^4$  células por poço e tratadas com AT, nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 37,5; 50; 75  $\mu$ M durante 72 horas. As células controle foram expostas ao DMSO (0,05%).

## 2.2. Cultivo de linhagem celular

A linhagem de glioma C6 foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection* - Rockville, Maryland, USA), cultivada em meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 5% de SFB e mantida sob condições padrões de cultivo. Após atingirem uma confluência necessária, as células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço e tratadas com o AT nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 37,5; 50; 75  $\mu$ M durante 24 e 48 e 72 h. Células controle foram expostas ao DMSO (0,05%).

## 2.3. Citotoxicidade celular

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

## 2.5. Protocolo *in vivo*

As células C6 foram ressuspensas em meio DMEM e injetadas (3  $\mu$ L) no estriado dos animais (coordenadas em relação ao bregma, 3,0 mm lateral, 0,5 posterior e 6 mm de profundidade). Os animais foram pré-anestesiados com administração intraperitoneal (i.p.) de cetamina e xilazina. Cinco dias após a implantação do glioma, os animais foram divididos em dois grupos: (1) Glioblastoma + Veículo, (2) Glioblastoma + AT (50 mg/kg/dia). O tratamento foi administrado intragastricamente por 15 dias. Após 21 dias da implantação do tumor, os animais foram sacrificados e o cérebro foi removido, seccionado e fixado em formalina para posterior análise. Três seções do cérebro de cada animal foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e posteriormente analisadas por uma patologista. Para quantificação do tamanho do tumor, as imagens foram capturadas usando um microscópio conectado a uma câmera e a área do tumor ( $\text{mm}^2$ ) foi quantificada usando o software ImageJ. O volume total do tumor ( $\text{mm}^3$ ) foi calculado multiplicando a seção da fatia e adicionando a área segmentada.

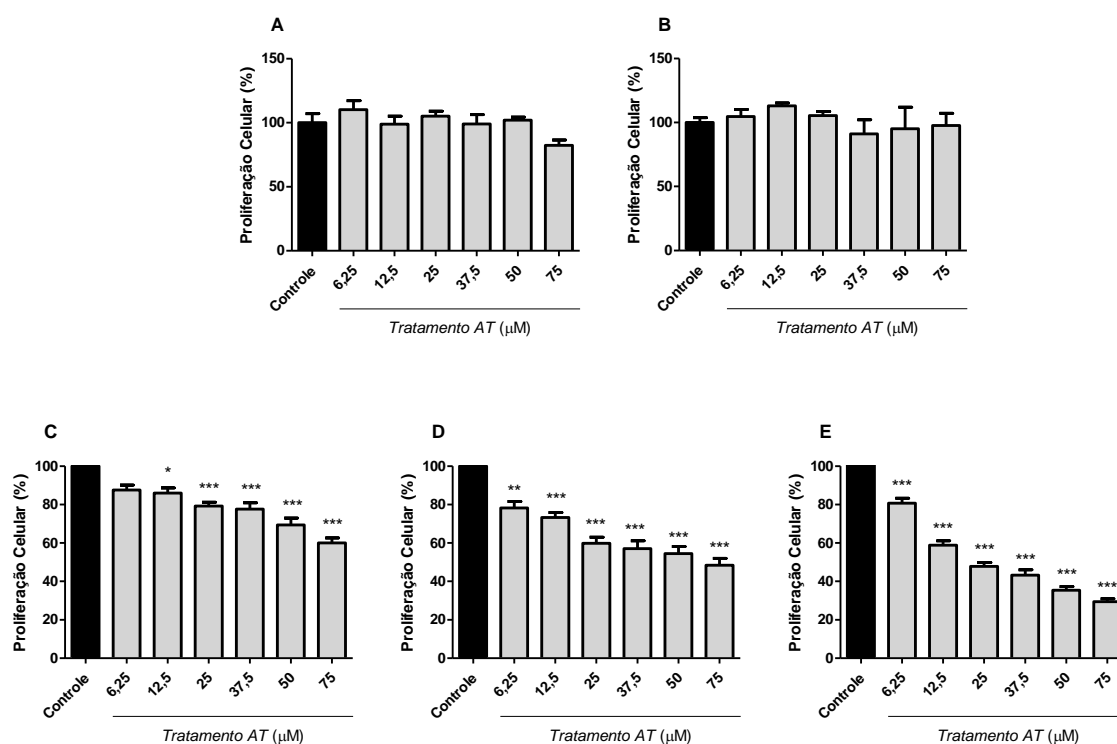
## 2.5. Análise estatística

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

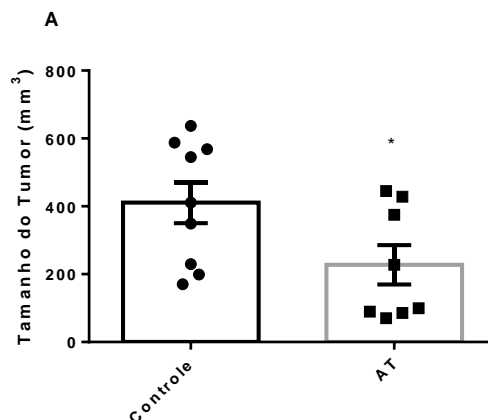
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos observar que o AT foi capaz de reduzir significativamente a proliferação celular (Figura 1 C-E). Além disso, essa redução ocorreu de forma concentração-tempo dependente, sendo assim o maior efeito foi encontrado na concentração de 75  $\mu\text{M}$  no tempo de exposição de 72 h, com 70% de redução na proliferação celular quando comparado ao controle. Ademais, podemos inferir uma seletividade de efeito do AT, visto que não houve citotoxicidade frente ao cultivo primário de astrócitos, demonstrando seu efeito somente em células tumorais de GB (C6) (Figura 1 A e B).

Após ser verificada a atividade anti glioma *in vitro*, foi realizado o implante de tumor *in vivo*. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que os animais que receberam o tratamento com AT, na dose de 50 mg/kg/dia pelo período de 15 dias, apresentaram uma redução significativa no tamanho do tumor ( $227,6 \pm 58,16 \text{ mm}^3$ ) quando comparados ao controle ( $410,7 \pm 60,64 \text{ mm}^3$ ) (Figura 2).



**Figura 1.** Avaliação citotóxica do ácido tânico (AT) frente ao cultivo primário de astrócitos, nos tempos de 48 (A) e 72 h (B) e na proliferação celular em linhagem tumoral de glioblastoma multiforme (C6) nos tempos de 24 (C), 48 (D) e 72 h (E). 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.** Volume total ( $\text{mm}^3$ ) determinado usando o software ImageJ ( $n = 8-9$ ). Os dados foram analisados pelo teste t de Student. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

#### 4. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou um potencial efeito antiglioma do AT, visto que apresentou citotoxicidade seletiva frente a linhagem de GB (C6), bem como diminuiu significativamente a massa tumoral no modelo *in vivo* de GB em ratos.

#### 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.
- GIESE, A. et al. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. **Journal of clinical oncology**, v. 21, n. 8, p. 1624-1636, 2003.
- LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.
- SEN, Halil Murat et al. Effects of tannic acid on the ischemic brain tissue of rats. **Inflammation**, v. 38, n. 4, p. 1624-1630, 2015.
- THAKKAR, Jigisha P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, 2014.
- WILSON, Taylor A.; KARAJANNIS, Matthias A.; HARTER, David H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. **Surgical neurology international**, v. 5, 2014.