

ESTRESSE OXIDATIVO E O EFEITO DUAL DO EXTRATO DE *Psidium cattleianum* EM CULTURAS DE CÉLULAS DE RATO C6 E ASTRÓCITO: EXPLORANDO POSSÍVEIS MECANISMOS

LORENÇO TORRES MENDONÇA¹; NATÁLIA PONTES BONA²; NATHALIA STARK PEDRA²; FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS²; MAYARA SANDRELLY PEREIRA SOARES²; FRANCIELI MORO STEFANELLO³

¹Universidade Federal de Pelotas – lorencotorres@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo (EO) é descrito como um desequilíbrio entre o sistema antioxidante do organismo e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O EO pode provocar a oxidação de estruturas celulares importantes, promovendo disfunção celular e o desenvolvimento de doenças (ROJO DE LA VEJA; CHAPMAN; ZHANG, 2018). No entanto, sabe-se que as ERO são importantes moléculas sinalizadoras e regulam processos celulares, como progressão do ciclo celular e proliferação. Diversos tipos de tumores se beneficiam de um ambiente ligeiramente pró-oxidante para dar suporte ao seu crescimento e proliferação (LIOU; STORZ, 2010).

Nos últimos anos, o papel dual dos antioxidantes vem ganhando destaque. Polifenóis ao serem oxidados dão origem a compostos altamente reativos, conhecidos como quinonas. As quinonas são tóxicas e podem interagir com a cadeia lateral de aminoácidos nucleofílicos, como a lisina, histidina e cisteína (BOLTON; DUNLAP, 2016). Diversas quinonas derivadas de polifenóis são conhecidas por inibir a atividade de enzimas antioxidantes, resultando em um EO brando, porém levam a adaptação celular por meio da ativação de vias de resposta ao estresse (CEBULA; SCHIMIDT; ARNÉR, 2015). Essa resposta adaptativa a insultos tóxicos é conhecida como hormese, e ainda é pouco explorada no contexto do câncer.

A diferença do estado redox entre células tumorais e células normais pode auxiliar na obtenção de terapias mais efetivas no tratamento do câncer. Células tumorais, por apresentarem um microambiente mais oxidante, se tornam mais suscetíveis a insultos oxidantes (LIOU; STORZ, 2010). Nesse sentido, o conceito de hormese pode ser explorado para obter terapias menos tóxicas. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi comparar o efeito da exposição do extrato de frutos de *Psidium cattleianum* (araçá amarelo) como fonte de polifenóis frente à células normais (astrócito primário) e tumorais (glioma de rato C6) sob níveis de ERO e proliferação celular. E avaliar a interação do composto majoritário do extrato (ácido elágico) com a enzima antioxidante tiorredoxina redutase 1 (TrxR1) através de docking molecular.

2. METODOLOGIA

Para a obtenção do extrato, foram utilizados 80g do fruto congelado sonicados por 30 minutos em 70:30 v/v etanol–água. O extrato foi filtrado, o etanol foi removido sob pressão reduzida, e lyophilizado. A linhagem de glioma de rato C6 foi obtida através da American Cell Type Culture Collection. A cultura primária de

astrócitos foi feita conforme descrito por Da FROTA Jr. et al. (2009). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, semeadas em placas de 96 ou 6 poços e mantidas sob condições padrão de cultivo celular. As células foram tratadas com o extrato por 72 h nas concentrações de 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL. Células mantidas em DMEM na ausência de tratamento foram utilizadas como controle. A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio da sulforodamina B. Níveis de ERO foram quantificados pelo método do diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA). Para a análise de docking molecular, foi utilizado o programa UCSF Chimera. A estrutura da TxrR1 foi obtida no Protein Database (ID 3EAN) e a estrutura do ácido elágico no PubChem. As moléculas de água foram removidas do receptor, e ambas as estruturas tiveram sua energia minimizada. O sítio de ligação foi designado próximo ao sítio ativo da enzima ($x = -118.54$, $y = -7.66$, $z = 43.22$). A imagem de interação do receptor-ligante foi feita através do programa BIOVIA Discovery Studio 2019. Para a análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism 6. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido de post-hoc de Tukey. Resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. Resultados são expressos como porcentagem em relação ao grupo controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da proliferação celular (figura 1) revelou que o tratamento com extrato de *Psidium cattleianum* não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas no tempo de 72 h em cultura primária de astrócitos (A), mostrando que o tratamento foi proliferativo nas concentrações de 1000 (158%) e 1500 µg/mL (138%) em relação ao controle. Em comparação, células de glioma de rato C6 expostas ao mesmo tratamento pelo mesmo período (B), tiveram sua proliferação reduzida, mais notavelmente nas concentrações de 1000 (62%), 1500 (51%) e 2000 µg/mL (47%).

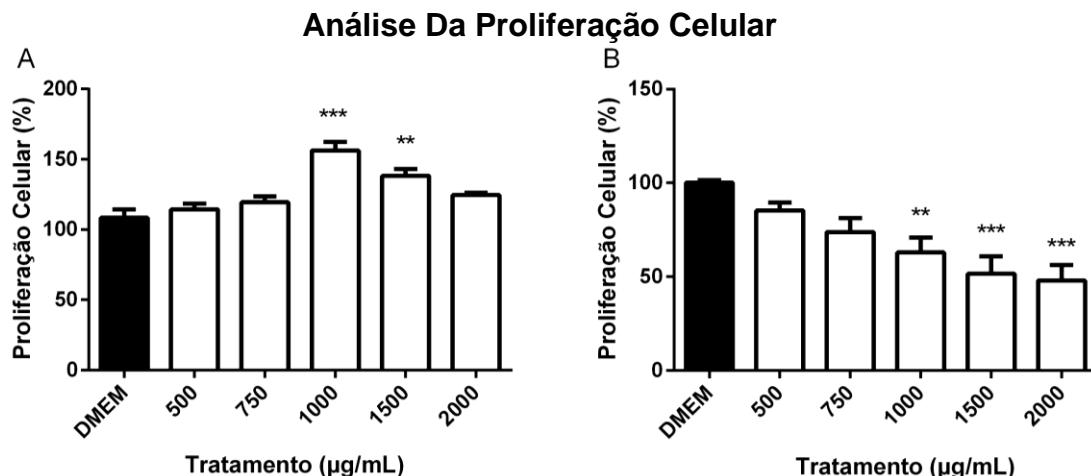


Figura 1: Avaliação do efeito proliferativo do extrato de *Psidium cattleianum* em culturas de astrócito primário (A) e C6 (B). Dados são expressos como média ± desvio padrão. (**) Diferença significativa quando comparado ao controle ($P \leq 0,01$). (***) Diferença significativa quando comparado ao controle ($P \leq 0,001$).

O tratamento com extrato de *Psidium cattleianum* no tempo de 72 h foi eficaz em reduzir os níveis de ERO em cultura de astrócitos (A), apresentando reduções de mais de 50% nas concentrações mais altas. No entanto, o mesmo

tratamento produziu o efeito oposto em células de glioma de rato C6, apresentando níveis cerca de 3 vezes maiores nas concentrações de 1500 e 2000 µg/mL, quando comparado ao controle.

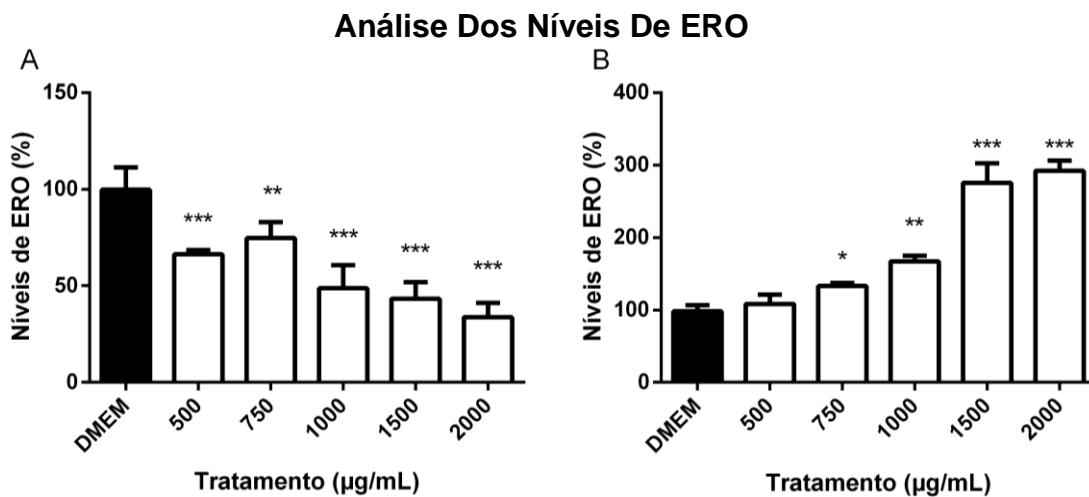


Figura 2: Análise dos níveis de ERO em culturas de astrócito primário (A) e C6 (B) expostas ao extrato de *Psidium cattleianum*. Dados são expressos como média ± desvio padrão. (**) Diferença significativa quando comparado ao controle ($P \leq 0,01$). (***) Diferença significativa quando comparado ao controle ($P \leq 0,001$).

A análise fitoquímica do extrato de *Psidium cattleianum* (dados não mostrados) revela que o composto majoritário é o ácido elágico, além de apresentar uma grande diversidade de outros polifenois. Nossos achados vão de encontro com os resultados na literatura, onde polifenois apresentam um efeito dual em células tumorais e não tumorais. Especula-se que o EO seja o responsável por esse efeito. Estudos *in vitro* revelam que o efeito dessas moléculas é significativamente reduzido na presença de antioxidantes enzimáticos, como a catalase (ZOU et al., 2016). Ainda, a superexpressão de enzimas antioxidantes é uma característica comum em tumores, sugerindo que essas células necessitam de um delicado balanço nos níveis de ERO para manutenção de suas funções (LIOU; STORZ, 2010). Sendo assim, é possível afirmar que polifenois atuam por vias mais complexas e que resultam no aumento de ERO e consequente morte celular (CEBULA; SCHIMIDT; ARNÉR, 2015).

A TrxR1 é um enzima superexpressa em tumores, e recentemente tornou-se um alvo promissor para a obtenção de novos quimioterápicos. A TrxR1 é responsável por manter o balanço entre ditiois/dissulfetos, e sua inibição provoca aumento de ERO e dano celular (ZOU et al., 2016). Adicionalmente, sua inibição está relacionada com a ativação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), o principal regulador da expressão de genes antioxidantes (CEBULA; SCHIMIDT; ARNÉR, 2015). O que pode explicar a diminuição de ERO em células normais. Ainda, a regulação positiva do Nrf2 está relacionado com maior quimiorresistência, estratégia que pode ser utilizada para diminuir toxicidade sistêmica pelo uso de quimioterápicos (ROJO DE LA VEJA; CHAPMAN; ZHANG, 2018).

A figura 3 mostra a possível interação do ácido elágico com a TrxR1. A interação entre as duas estruturas foi de grande afinidade, evidenciada pela formação de 5 pontes de hidrogênio e um score de energia livre de ligação de -9.9. A inibição da TrxR1 pelo ácido elágico já foi demonstrada em um estudo com parasitas, no entanto, sua inibição ainda não foi demonstrada em células mamíferas (STURM et al., 2008).

Possível Interação Entre O Ácido Elágico E A TrxR1

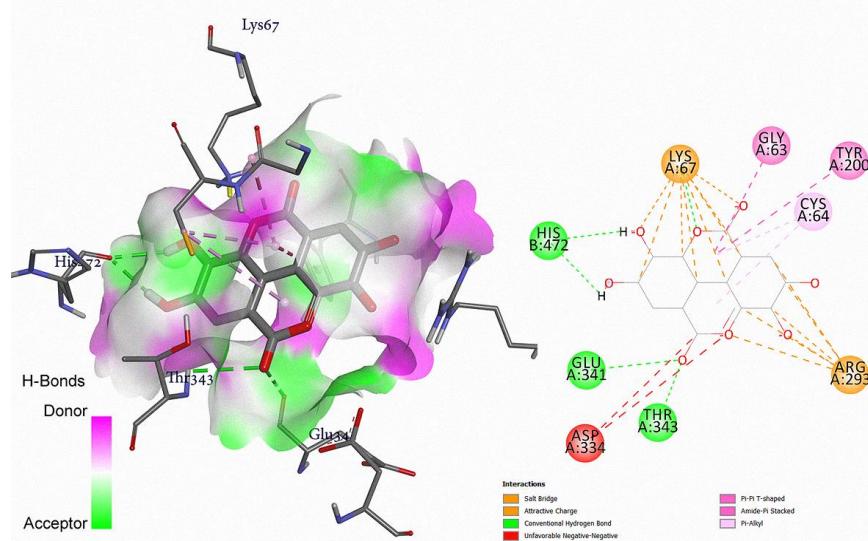


Figura 3: Simulação da interação do ácido elágico com o sítio ativo da enzima TrxR1

4. CONCLUSÕES

Esse estudo demonstrou pela primeira vez o efeito dual do extrato de *Psidium cattleianum* em culturas de astrocito primário e de glioma de rato C6. A elucidação desses mecanismos pode fornecer estratégias para obtenção de terapias menos tóxicas e mais efetivas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLTON, J; DUNLAP, T. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 13–37, 2016

CEBULA, M; SCHMIDT, E.; ARNÉR, J. TrxR1 as a Potent Regulator of the Nrf2-Keap1 Response System. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 10, p. 823–853, 2015

DA FROTA, M. L. J. et al. 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, n.1, p.13-20, 2009.

LIOU, G; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Research**, v. 44, n. 5, p. 479–496, 2010.

ROJO DE LA VEGA, M; CHAPMAN, E; ZHANG, d. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. **Cancer Cell**, v. 34, n. 1, p. 21–43, 2018

STURM, N. et al. Compounds Structurally Related to Ellagic Acid Show Improved Antiplasmodial Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 622–630, 2008.

ZOU, P et al. Piperlongumine as a direct TrxR1 inhibitor with suppressive activity against gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 375, n. 1, p. 114–126, 2016