

## 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 MENDONÇA<sup>1</sup>; NATÁLIA PONTES BONA<sup>2</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>2</sup>; FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS<sup>2</sup>; MAYARA SANDRELLY PEREIRA SOARES<sup>2</sup>; FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – lorencotorres@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Universidade 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 tioredoxina redutase 1 (TrxR1) através de docking molecular.

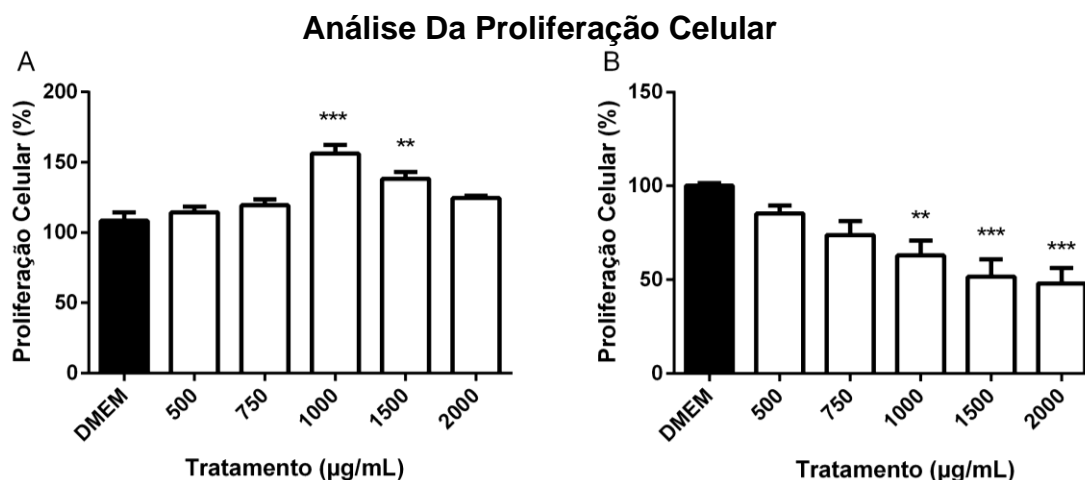
### 2. METODOLOGIA

Para a obtenção do extrato, foram utilizados 80g do fruto congelado sonificados por 30 minutos em 70:30 v/v etanol-água. O extrato foi filtrado, o etanol foi removido sob pressão reduzida, e liofilizado. 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

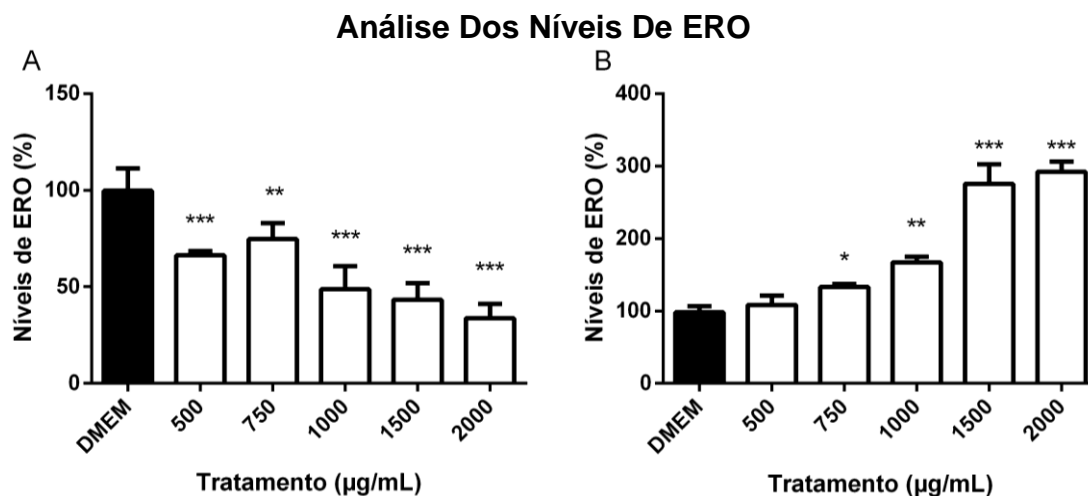
A análise da proliferação celular (figura 1) revelou que o tratamento com extrato de *Psidium cattleianum* não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas no tempo de 72 h em cultura primária de astrócitos (A), mostrando que o tratamento foi proliferativo nas concentrações de 1000 (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  $\pm$  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.



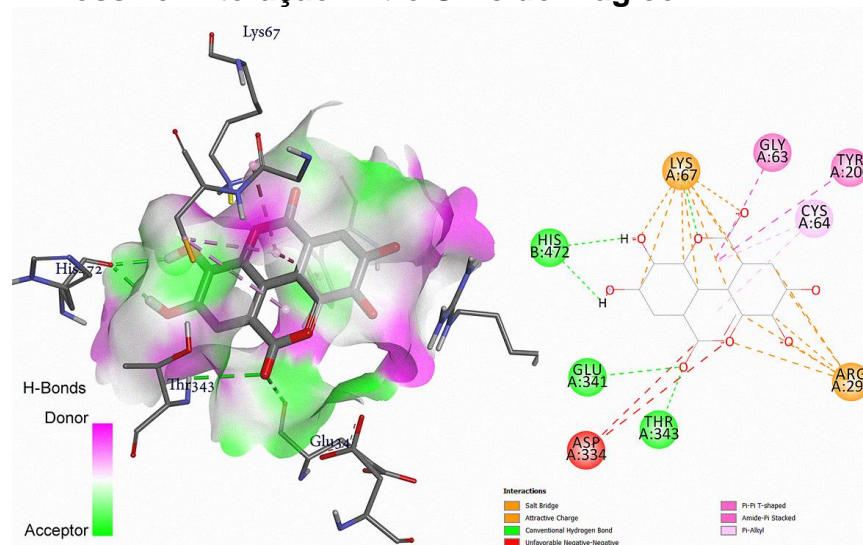
**Figura 2:** Análise dos níveis de ERO em culturas de astrócito primário (A) e C6 (B) expostas ao extrato de *Psidium cattleianum*. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. (\*\*) Diferença significativa quando comparado ao controle ( $P \leq 0,01$ ). (\*\*\*) Diferença significativa quando 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 polifenóis. Nossos achados vão de encontro com o resultados na literatura, onde polifenóis 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 polifenóis 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