

ÁCIDO TÂNICO REESTABELECE A HOMEOSTASE REDOX EM CÉREBRO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE GLIOBLASTOMA

NATÁLIA PONTES BONA¹; NATHALIA STARK PEDRA²; LUIZA SPOHR³; BERNARDO DE MORAES MEINE⁴; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – bemeine15@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) é o caso mais comum de tumor cerebral primário maligno. Apresenta uma incidência de 3,19 casos por 100.000 habitantes por ano e um prognóstico extremamente negativo, exibindo uma taxa de sobrevida em 5 anos de 4-5% e de 26-33% aos 2 anos em ensaios clínicos (RAZAVI et al., 2016; BATASH et al., 2017). O tratamento para o GBM é considerado multimodal, onde é realizada ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Estudos demonstram um progresso nos tratamentos, porém a sobrevida média geral dos pacientes ainda permanece insatisfatória, sendo em torno de 15 meses após o diagnóstico (CARLSSON et al., 2014). Essa baixa taxa de sobrevida pode ser atribuída às limitações do tratamento, bem como a natureza difusa do GBM e também a uma incompleta compreensão da fisiopatologia do tumor.

Em torno de 90% de todos os cânceres humanos apresentam uma causa ambiental (herança não genética) principalmente por meio de opções de estilo de vida, enquanto os outros 10% são devido a infecções e exposições a produtos químicos. O câncer envolve diversos estágios, apresentando alterações mutacionais e proliferação descontrolada, com isso estudos vêm relacionando o papel causal e contributivo do estresse oxidativo na iniciação e progressão do câncer (KLAUNIG, 2018).

Levando em consideração que pacientes acometidos pelo GBM apresentam um alto índice de mortalidade, que o tratamento ainda é uma limitação e o envolvimento do estresse oxidativo na progressão do tumor, torna-se crescente o interesse em se estudar alternativas terapêuticas a fim de proporcionar uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes com GBM. Devido a isso, os produtos naturais antioxidantes são um importante alvo para o manejo clínico de diversas patologias, em especial o ácido tânico (AT) que apresenta atividade antitumoral e efeitos bem comprovados em doenças que acometem o Sistema Nervoso Central (SEN et al., 2015; GERZSON et al., 2019; BONA et al., 2020).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antiglioma *in vivo* do AT e sua ação frente aos parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos submetidos ao modelo pré-clínico de GBM.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais

O modelo *in vivo* de GBM foi realizado com a utilização de 50 ratos Wistar machos com 60 dias de idade (250-300 g). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da instituição, sob o número de protocolo CEEA 31292-2018.

2.5. Protocolo *in vivo*

As células C6 foram diluídas em meio DMEM e injetadas (3 µL) no estriado dos ratos (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 três grupos: (1) Sham + Veículo, (2) GBM + Veículo, (3) GBM + AT (50 mg/kg/dia). O tratamento foi administrado intragasticamente por 15 dias. Após 21 dias da implantação do tumor, os animais foram eutanasiados e divididos de forma aleatória para posteriores análises. Para a quantificação do tumor, três seções do cérebro de cada animal foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), as imagens foram capturadas e a área do tumor foi quantificada usando o software ImageJ. O volume total do tumor (mm³) foi calculado multiplicando a seção da fatia e adicionando a área segmentada. Para análises dos parâmetros de estresse oxidativo foi retirado o cérebro total dos animais.

2.3. Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

2.3.1. Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Foram avaliados segundo DOS SANTOS et al. (2017), através do ensaio de diacetato de 2'-7'-dicitroclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA).

2.3.2 Conteúdo tólico total

Foi avaliado segundo método de AKSENOV & MARKESBERY (2001), através da redução do ácido ditionitrobenzoico (DTNB) por tios, formando um derivado amarelo.

2.3.3. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada de acordo com MISRA & FRIDOVICK (1972), utilizando método baseado na inibição da auto-oxidação da adrenalina depende de superóxido.

2.3.4 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com AEBI (1984), utilizando método baseado na decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando 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

De acordo com os resultados obtidos no protocolo pré-clínico, 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 1). Estudos anteriores relataram o efeito antiglioma *in vitro* do AT, porém esse é o primeiro trabalho que demonstra os efeitos *in vivo* do composto (BONA et al., 2020). Além de corroborar com os dados previamente descritos, ressalta o potencial antiglioma do AT.

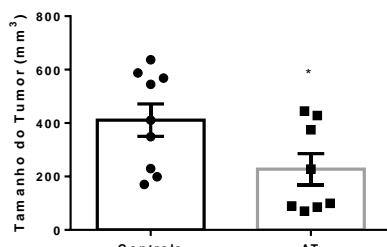


Figura 1. Volume total (mm^3) determinado usando o software ImageJ ($n = 8-9$). Os dados foram analisados pelo teste t de Student. * $P<0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Na figura 2 podemos observar os resultados referentes aos parâmetros de estresse oxidativo. Houve um aumento significativo nos níveis de ROS no grupo controle quando comparado com o grupo sham, e essa alteração foi parcialmente revertida pelo tratamento com AT. Quanto a atividade da enzima superóxido dismutase, foi possível verificar uma diminuição no grupo controle quando comparado ao grupo sham, e o tratamento foi capaz de reverter essa diminuição. Não observamos diferenças significativas nos níveis de conteúdo tiólico total e na atividade da enzima catalase no grupo tratado. O estresse oxidativo é uma característica comum a vários tipos de células cancerosas, sendo caracterizado pela formação descontrolada de ROS comprometendo o metabolismo celular e levando à promoção de malignidade celular e início e progressão tumoral (Acharya et al., 2010). A regulação do estresse oxidativo é um fator importante no desenvolvimento de novas terapias antineoplásicas (Gorrini et al., 2013).

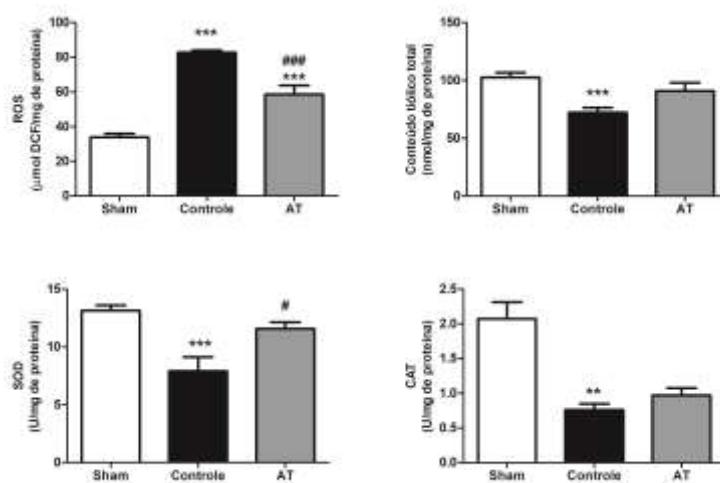


Figura 2. Efeito do tratamento com ácido tânico (AT) nos níveis de ROS, conteúdo tiólico total e atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em cérebro de ratos submetidos ao modelo pré-clínico de glioblastoma. (**) $P<0,01$ e (***) $P<0,001$ comparado com o grupo Sham, (#) $P<0,05$ e (###) $P<0,001$ comparado com o grupo controle.

4. CONCLUSÕES

O AT demonstrou ser um importante alvo no tratamento para o GBM pois foi capaz de reduzir significativamente o tamanho do tumor, além disso foi capaz de reduzir os níveis de ROS e restabelecer a atividade da enzima SOD.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, A. et al. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 3, n. 1, p. 23-34, 2010.
- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, 1984. p. 121-126.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.
- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 637-648, 1992.
- BATASH, R. et al. Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 27, p. 3002-3009, 2017.
- BONA, N. P. et al. Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, n. 2, p. 283-293, 2020.
- CARLSSON, S. K.; et al. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. **EMBO molecular medicine**, v. 6, n. 11, p. 1359-1370, 2014.
- GERZSON, M. F. B. et al. Effects of tannic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's Disease: insights into memory, redox status, Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activity. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1-8, 2019.
- GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-947, 2013.
- KLAUNIG, J. E. Oxidative stress and cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 40, p. 4771-4778, 2018.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
- RAZAVI, S. et al. Immune evasion strategies of glioblastoma. **Frontiers in surgery**, v. 3, p. 11, 2016.
- SEN, H. M. et al. Effects of tannic acid on the ischemic brain tissue of rats. **Inflammation**, v. 38, n. 4, p. 1624-1630, 2015.