

IMPACTO DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A REGULAÇÃO DO ESTADO REDOX EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE GLIOBLASTOMA

NATHALIA STARK PEDRA¹; NATÁLIA PONTES BONA²; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES³; LUÍZA SPOHR⁴; FERNANDO LOPEZ ALVES⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fernando.lopez.alves@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Glioblastoma (GB) consiste do tumor cerebral mais agressivo do sistema nervoso central (SNC) cujos mecanismos complexos de malignidade incluem elevada taxa de proliferação, invasão, angiogênese e necrose (LOUIS et al., 2016). Diante da elevada agressividade do GB, apesar das estratégias terapêuticas atualmente utilizadas, os pacientes acometidos pelo GB exibem baixo prognóstico com uma sobrevida média de apenas 16 meses (OSTROM et al., 2018). É bem estabelecido que a inflamação crônica presente no microambiente tumoral favorece o desenvolvimento do estresse oxidativo, o qual é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante (RAMÍREZ-EXPÓSITO; MARTÍNEZ-MARTOS, 2019).

De maneira geral, o SNC possui uma elevada taxa metabólica sendo particularmente sensível aos danos causados pelos radicais livres, especialmente as espécies reativas de oxigênio (ERO) (RAMÍREZ-EXPÓSITO; MARTÍNEZ-MARTOS, 2019). No GB, os elevados níveis basais de ERO no interior das células reagem com macromoléculas desencadeando danos aos lipídeos, proteínas e DNA, favorecendo assim a progressão tumoral (ILLAN-CABEZA et al., 2013). Neste contexto, novos tratamentos capazes de modular o estado redox poderiam reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo.

O ácido gálico (AG) é um potente antioxidante amplamente encontrado em produtos naturais e tem sido extensivamente estudado como agente anti-inflamatório e antitumoral (HSU et al., 2016; KAHKESHANI et al., 2019). Diversos estudos têm reportado a atividade citotóxica do AG sobre linhagens de GB humano (LU et al., 2010; PAOLINI et al., 2015; HSU et al., 2016), no entanto não há dados disponíveis na literatura descrevendo o seu papel na regulação do estresse oxidativo no microambiente tumoral. Neste sentido, o presente estudo visou investigar o efeito do AG na modulação do estado redox em modelo pré-clínico de GB.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Ratos *Wistar* machos com 60 dias de idade (320-370 g, n=20) foram utilizados para realização do protocolo pré-clínico de GB. Todos os procedimentos envolvendo animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel, sob o número de protocolo CEEA 31292-2018.

2.1. Protocolo pré-clínico de GB

A linhagem de glioma C6 foi cultivada em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantida em estufa a 37 °C com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Após atingir a confluência de 90%, as células foram injetadas no estriado dos animais (coordenadas em relação ao bregma, 3,0 mm lateral, 0,5 posterior e 6,0 mm de profundidade). Os ratos foram pré-anestesiados com administração intraperitoneal (i.p.) de cetamina e xilazina. Cinco dias após a implantação do GB, os animais foram divididos em quatro grupos: (1) Controle (tratado com água), (2) GB (tratado com água), (3) GB + AG (tratado com 50 mg/kg/dia) e (4) GB + AG (tratado com 100 mg/kg/dia). O tratamento foi administrado intragasticamente por 15 dias. Após 21 dias da implantação do tumor, os animais foram eutanasiados e o cérebro total foi removido para determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

2.3. Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo

Para determinação dos parâmetros de estresse oxidativo, o tecido cerebral foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 140 mM de KCl (pH 7,4), centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis de ERO (ALI et al., 1992), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990), o conteúdo tiólico total (SH) (AKSENOV; MARKESBERY, 2001) e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (MISRA; FRIDOVICH, 1972) e catalase (CAT) (AEBI, 1984).

2.4. Análise estatística

Os dados foram expressos como média±erro padrão e analisados por ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado na Figura 1A-B, os animais do grupo GB exibiram um aumento significativo nos níveis de ERO ($P<0,0001$) e TBARS ($P<0,05$) quando comparado ao grupo controle. Diversas *hallmarks* do câncer, tais como proliferação descontrolada e angiogênese são promovidas pelo aumento dos níveis de ERO (RAMÍREZ-EXPÓSITO; MARTÍNEZ-MARTOS, 2019). O GB é caracterizado por exibir elevadas quantidades de ERO intracelularmente, como ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) favorecendo o desenvolvimento de um microambiente oxidativo. Assim, a propagação de tais radicais livres pode desencadear a peroxidação lipídica nas membranas celulares, bem como a oxidação de proteínas (ILLAN-CABEZA et al., 2013). No presente estudo, o tratamento com AG foi capaz de impedir significativamente o aumento dos níveis de ERO ($P<0,0001$) e TBARS ($P<0,01$), assim como prevenir a redução de SH ($P<0,05$) (Figura 1C) promovida pelo GB.

Quanto às enzimas antioxidantes SOD e CAT, pode-se observar que o grupo GB diminuiu significativamente a atividade das mesmas ($P<0,0001$ e $P<0,001$, respectivamente), sendo essa alteração inibida pelo AG ($P<0,01$ e $P<0,01$, respectivamente) em ambas as doses avaliadas (Figura 1D-E).

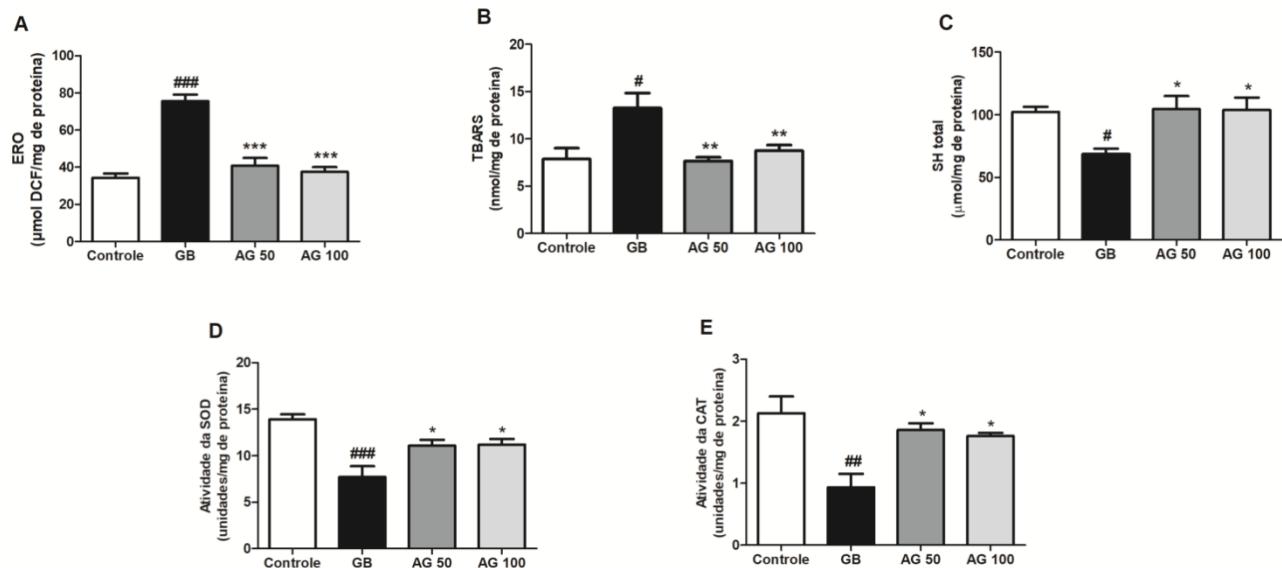


Figura 1. Efeitos do ácido gálico em parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos submetidos ao modelo pré-clínico de glioblastoma. Espécies reativas de oxigênio (ERO) (A); substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B); conteúdo tiólico total (SH) (C) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (D) e catalase (CAT) (E). #,##,### Estatisticamente diferente do grupo controle ($P<0,05$; $P<0,001$ e $P<0,0001$; respectivamente). *,**,*** Estatisticamente diferente do grupo GB ($P<0,05$; $P<0,001$ e $P<0,0001$; respectivamente)

As enzimas antioxidantes desempenham importante papel na remoção de radicais livres em excesso (RAMÍREZ-EXPÓSITO; MARTÍNEZ-MARTOS). A enzima SOD consiste na primeira linha de defesa antioxidante enzimática, a qual metaboliza o O_2^- em H_2O_2 e oxigênio molecular. No entanto, o acúmulo de H_2O_2 no tecido cerebral é amplamente tóxico, assim, visando prevenir este fenômeno, a enzima CAT atua detoxificando H_2O_2 e consequentemente reduzindo os danos induzidos pelos radicais livres (ILLAN-CABEZA et al., 2013). Diante dos resultados encontrados, sugere-se que o potencial antioxidante do AG pode reduzir os danos oxidativos presentes no microambiente tumoral.

4. CONCLUSÕES

No presente estudo o AG foi capaz de prevenir os danos promovidos pelo estresse oxidativo presente no microambiente tumoral de ratos submetidos ao modelo pré-clínico de GB. Tais resultados estimulam a investigação do potencial antioxidante do AG sobre a carcinogênese, visando auxiliar na busca por novas ferramentas capazes de proporcionar melhor prognóstico para os pacientes acometidos pelo GB.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121–126, 1984.

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, p.141-145, 2001.

ALI, S.; LEBEL, C.; BONDY, S.. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, p.637-648, 1992.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products : malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v.186, p.407-421,1990.

HSU, S.; CHOU, C.; LIAO, W.; SHIEH, P.; KUO, D.; KUO, C.; LIANG, W. The effect of gallic acid on cytotoxicity, Ca²⁺ homeostasis and ROS production in DBTRG-05MG human glioblastoma cells and CTX TNA2 rat astrocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 252, p. 61-73, 2016.

ILLÁN-CABEZA, A., GARCÍA-GARCÍA, A. R., MARTÍNEZ-MARTOS, J., RAMÍREZ-EXPÓSITO, M., PEÑA-RUIZ, T., MORENO-CARRETERO, M. A potential antitumor agent, (6-amino-1-methyl-5-nitrosouracilato-N3)-triphenylphosphine-gold(I): Structural studies and in vivo biological effects against experimental glioma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 260-272, 2013.

KAHKESHANI, N.; FARZAEI, F.; FOTOUHI, M.; Bahrami-Soltani, R.; Naseri, R.; Momtaz, S.; Abbasabadi, Z.; Rahimi, R.; Farzaei, M.; Bishayee, A. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 225, 2019.

LOUIS, D.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; DEIMLING, A.; BRANGER, D.; CAVENEY, W.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.; KLEIHUES, P.; ELLISON, D. 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.

LU, Y.; JIANG, F.; JIANG, H.; WU, K.; ZHENG, X.; CAI, Y.; TO, T. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, n. 2-3, p. 102-107, 2010.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

OSTROM, Q. T., RUBIN, J. B., LATHIA, J. D., BERENS, M. E., BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. Females have the survival advantage in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 20, n. 4, p.576-577, 2018.

PAOLINI, A.; CURTI, V.; PASI, F.; MAZZINI, G.; NANO, R.; CAPELLI, E. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 4, p. 1491-1497, 2015.

RAMÍREZ-EXPÓSITO, M. J.; MARTÍNEZ-MARTOS, J. M. The delicate equilibrium between oxidants and antioxidants in brain glioma. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 4, p. 342-351, 2019.