

## EXTRATO DE AMORA COMO UMA ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA GLIOBLASTOMA: REDUÇÃO SELETIVA DA VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM C6 *IN VITRO*

LARISSA MENEZES DA SILVEIRA<sup>1</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>2</sup>; NATÁLIA PONTES BONA<sup>3</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>4</sup>; FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS<sup>5</sup>; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>6</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – larissamenezes1999@gmail.com*

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

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – nataliabona@gmail.com*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas - rspanevello@gmail.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – tessmerfran@gmail.com*

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

### 1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GB) é um tumor cerebral extremamente agressivo e de alta malignidade, pois apresenta elevada atividade mitótica, capacidade de angiogênese e infiltração em tecidos circundantes, além de apresentar baixa resposta ou até mesmo resistência ao tratamento oncológico. Visto isso, é classificado de acordo com a Organização Mundial da Saúde como um tumor difuso de grau IV (JOHNSON; GIANNINI; KAUFMANN, 2020). Ademais, o GB é uma doença com alto índice de mortalidade e com um prognóstico insatisfatório, conferindo aos pacientes uma sobrevida média baixa em torno de 12 a 15 meses (THAKKAR et al., 2014).

Deste modo, a busca por tratamentos alternativos têm sido pesquisada e diversos estudos epidemiológicos relatam um efeito protetor do consumo de frutas vermelhas na incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como o câncer (MANGANARIS et al., 2013). Como exemplo de fruto vermelho tem-se a amora-preta (*Rubus sp.*), a qual apresenta composição rica em variados fitoquímicos do tipo fenólico, os quais lhe conferem alta atividade biológica, em especial as antocianinas, mas também flavonóis, ácidos fenólicos e taninos (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010).

Já são encontrados diversos estudos relatando o efeito protetor da amora-preta frente a diferentes linhagens de câncer, como, câncer de próstata (SEERAM et al., 2006), de útero e de colón (LAZZE et al., 2004). Tal propriedade apresenta forte influência das antocianinas que apresentam alta capacidade antioxidante, ou seja, exibem capacidade em inibir a degradação oxidativa por ação de radicais livres ou outras espécies reativas (SANTOS et al., 2007).

A partir dos relatos mencionados sobre o potencial anticarcinogênico da amora-preta frente a diferentes linhagens da patologia, percebe-se a ausência de estudos dirigidos especificamente para cânceres do sistema nervoso central e junto aos desafios encontrados para o tratamento dos mesmos, este trabalho objetivou a investigação do potencial antitumoral do extrato metanólico de amora frente à linhagem de glioma de rato C6.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Cultivo glioma C6

As células de glioma de rato C6 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, EUA). As células foram cultivadas em meio

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e então mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2.2 *Cultura primária de astrócitos*

Para a realização das culturas de astrócitos, utilizaram-se ratos machos *Wistar* com idade de 1-2 dias. Os animais foram submetidos à eutanásia e o córtex cerebral foi isolado, homogeneizado e o *pool* de células centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspensionado em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (pH 7,6). Os astrócitos foram semeados em uma densidade de  $3 \times 10^4$  células por poço em placas de 96 poços previamente preparadas com poli-L-lisina. As trocas de meio foram realizadas a cada 5 dias até a maturação celular (15-20 dias). As células foram cultivadas sob condições de temperatura (37°C), concentração de CO<sub>2</sub> (5%) e umidade controladas (GOTTFRIED et al., 1999). Cabe salientar que este protocolo foi previamente aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal, da UFPel (CEEA 31292-2018).

## 2.3 *Tratamento com extrato de amora-preta - concentrações e tempos de exposição*

O extrato de frutos de amora foi preparado utilizando a metodologia descrita por Bordignon et al. (2009). Inicialmente, o extrato de amora foi dissolvido em água estéril na concentração de 100 µg/mL (solução estoque) e então diluído em DMEM com 10% SFB para obter as concentrações de 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL. Após as células de linhagem C6 foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $5 \times 10^3$  e tratadas com extrato de amora nas concentrações de 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL por 24 h, 48 h e 72 h. Os astrócitos foram tratados com o extrato de amora (500, 1000, 1500 e 2000 µg/mL) por 72 h. Após os tratamentos, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Células expostas somente ao meio DMEM foram consideradas controle.

## 2.4 *Teste de viabilidade celular (MTT)*

Após o protocolo experimental nas placas de 96 poços, estas foram gentilmente lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e, em seguida, foram adicionados 50 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (0,5 mg/mL) por poço. Posteriormente, as células foram incubadas em estufa a 37°C e em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante 90 minutos. Por fim, o MTT foi removido e o precipitado formado eluído com 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura das absorbâncias se realizou em leitor de microplacas, utilizando-se o comprimento de onda de 492 nm.

## 2.5 *Análise estatística*

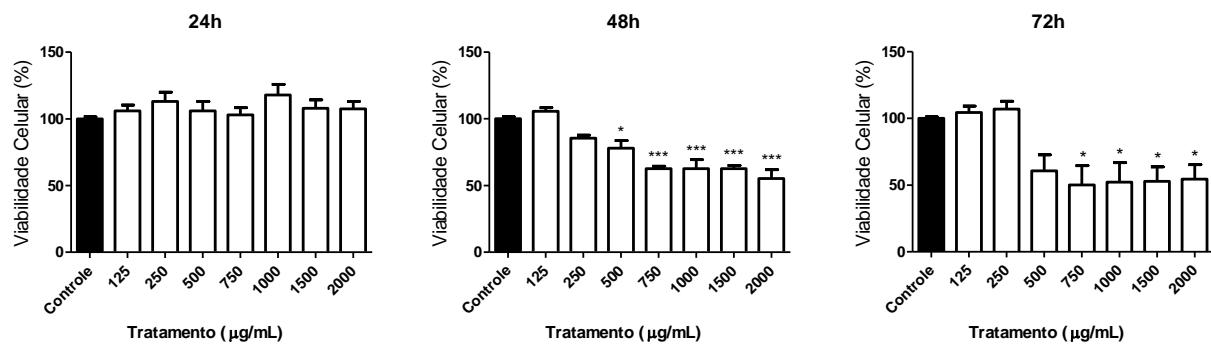
A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa quando  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos com média ± erro padrão.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade celular foi avaliada através de ensaio de MTT em três diferentes tempos, realizando-se a comparação de todas as concentrações testadas com as células controle. Os dados obtidos estão demonstrados nos gráficos abaixo (**Figura 1**) e demonstram que após o tratamento durante 24 h com

o extrato de amora não foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das células de glioma C6, quando comparada com as células não tratadas ( $P>0.05$ ). Entretanto, após 48 h de exposição ao tratamento com extrato de amora, foi possível observar uma redução significativa na viabilidade celular da linhagem C6 a partir da concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $P<0.05$ ). Resultados similares foram encontrados quando as células de glioma C6 foram expostas ao extrato de amora durante 72 h, onde foi possível observar um redução da viabilidade celular a partir da concentração de 750  $\mu\text{g/mL}$  ( $P<0.05$ )

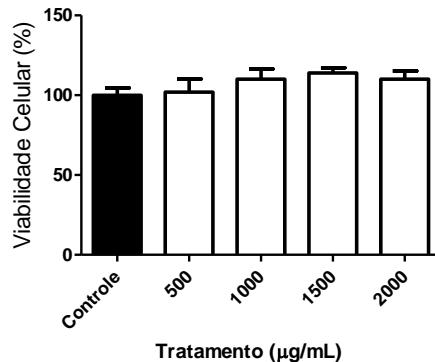
#### Viabilidade celular (MTT) – células de linhagem C6



**Figura 1.** Efeito do tratamento com extrato de amora (125-2000  $\mu\text{g/mL}$ ) em células de glioblastoma C6, após exposição durante 24 h, 48 h e 72 h. Dados estão expressos com percentagem do controle. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  comparado com as células controles.

Ainda, verificou-se que as culturas celulares de astrócitos tratadas com o extrato de amora nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ , não demonstraram alteração significativa de viabilidade celular após 72 h (**Figura 2**).

#### Viabilidade celular (MTT) – astrócitos



**Figura 2.** Efeito do tratamento com extrato de mirtilo (500 e 600  $\mu\text{g/mL}$ ) em cultura primária de astrócitos após exposição de 72 h.

Com base nos dados acima, nota-se que o extrato de amora apresentou seletividade ao diminuir a viabilidade das células de glioblastoma C6 sem provocar comprometimento na viabilidade dos astrócitos. Tal característica se mostra de suma importância, visto que tratamentos antineoplásicos habituais costumam atingir ambos os grupos celulares o que dificulta a recuperação saudável do paciente causando efeitos adversos (ANDRADE; SILVA, 2007).

Tendo conhecimento que o extrato de amora-preta utilizado no presente estudo apresenta composição rica em antocianinas (CHAVES et al., 2020), acredita-se que os resultados obtidos decorreram-se da ação destas. Pois, como

já descrito, as antocianinas apresentam capacidade em inibir o crescimento e induzir apoptose de diferentes linhagens cancerosas (LAZZE et al., 2004).

#### 4. CONCLUSÕES

A partir do que foi proposto os resultados obtidos até o momento, sustentam que o extrato de amora apresenta potencial antineoplásico frente a linhagem de glioblastoma C6, sem provocar danos a células saudáveis de astrócitos. Tais dados, subsistem futuros estudos para compreensão dos mecanismos de ação do extrato de amora-preta.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. DE; SILVA, S. R. DA. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 3, p. 331–335, 2007.

BORDIGNON, C. L. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183–188, jan. 2009.

BOWEN-FORBES, C. S.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 6, p. 554–560, 2010.

CHAVES, V. C. et al. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. **Neuroscience Letters**, v. 714, n. October 2019, p. 134566, 2020.

GOTTFRIED, C. et al. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: Specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). **Brain Research**, v. 833, n. 2, p. 142–149, 3 jul. 1999.

JOHNSON, D. R.; GIANNINI, C.; KAUFMANN, T. J. Review of WHO 2016 Changes to Classification of Gliomas; Incorporation of Molecular Markers. In: **Glioma Imaging**. [s.l.] Springer International Publishing, 2020. p. 127–138.

LAZZE, M. C. et al. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 8, p. 1427–1433, 1 ago. 2004.

MANGANARIS, G. A. et al. **Berry antioxidants: Small fruits providing large benefits**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013.

SANTOS, M. H. DOS et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604–610, 2007.

SEERAM, N. P. et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9329–9339, 13 dez. 2006.

THAKKAR, J. P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 23, n. 10, p. 1985–1996, 2014.