

EXTRATO DE *Cecropia pachystachya* MODULA O STATUS REDOX EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE GLIOBLASTOMA

NATÁLIA PONTES BONA¹; NATHALIA STARK PEDRA²; FERNANDO LOPEZ ALVEZ³; BERNARDO DE MORAES MEINE⁴; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fernando.lopez.alvez@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – bemeine15@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O GB é o tipo de astrocitoma primário com maior taxa de malignidade, responsável por mais de 60% de todos os tumores cerebrais em adultos (ROCK et al., 2014). O tratamento é considerado multimodal, onde é realizada a associação da ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia (CARLSSON et al., 2014). Apesar do progresso nos estudos, o GB ainda é uma doença mortal com um prognóstico extremamente baixo e uma sobrevida média de aproximadamente 14 a 15 meses após o diagnóstico (TAKKAR et al., 2014).

Aproximadamente 90% de todos os cânceres que acometem os humanos apresentam uma herança não genética, ou seja, ligada a fatores ambientais, normalmente relacionada ao estilo de vida, enquanto o restante (10%) é relacionado a infecções e exposições a produtos químicos. O câncer apresenta diversos estágios, onde desenvolve alterações mutacionais e proliferação descontrolada, a partir disso, a comunidade científica vem estudando e procurando relacionar a contribuição do estresse oxidativo na iniciação e progressão do câncer (KLAUNIG, 2018).

Devido ao baixo prognóstico e a ineficácia nos tratamentos disponíveis, a busca por novos agentes terapêuticos tem se tornado de suma importância. Produtos naturais com atividade antioxidante são alvos relevantes no tratamento de diversas patologias dentre elas o GB (BONA et al., 2020; PEDRA et al., 2018). Nesse contexto, destaca-se o extrato de *Cecropia pachystachya* (CEC), que apresenta efeitos bem elucidados em doenças que acometem o SNC (GAZAL et al., 2014; 2015).

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antitumoral e antioxidante do extrato de CEC.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais

O modelo pré-clínico de GB foi realizado com a utilização de 30 ratos Wistar machos com 60 dias de idade (250-300 g) obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Instituição, sob o número de protocolo CEEA 31292-2018.

2.2. Preparação do extrato

O extrato de CEC foi obtido através das folhas da planta e preparado por infusão aquosa segundo GAZAL et al. (2014). O extrato bruto foi seco e armazenado em freezer a -20°C.

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) GM + Veículo, (3) GB + CEC (200 mg/kg/dia). O tratamento foi administrado intragastricamente por 15 dias. Após 21 dias da implantação do tumor, os animais foram eutanasiados e o cérebro foi coletado para posteriores análises. Para a quantificação do tumor, seções do cérebro dos animais foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), as imagens foram capturadas e a área do tumor foi quantificada usando o software ImageJ. 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'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA).

2.3.2 Conteúdo tiólico total

Foi avaliado segundo método de AKSENOV & MARKESBERY (2001), através da redução do ácido ditionitrobenzoico (DTNB) por tiois, 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 dependente 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).

2.3.5 Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada de acordo com HABIG et al. (1974), onde a atividade GST é medida usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato.

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

A partir dos resultados demonstrados na Figura 1, referentes ao modelo pré-clínico de GB, foi possível observar que ocorreu uma redução significativa no

tamanho do tumor nos animais que receberam o tratamento com CEC ($295,1 \pm 122,7$), na dose de 200 mg/kg/dia durante 15 dias, quando comparamos com os animais que não receberam tratamento, o grupo controle ($772,3 \pm 149,1$). Pesquisadores recentemente relataram o efeito antitumoral em outras linhagens de câncer (Pereira et al., 2020). Ainda, estudos preliminares do nosso grupo foram realizados demonstrando o efeito *in vitro* antiglioma do CEC. É importante mencionar que esse é o primeiro trabalho demonstrando o efeito do CEC em modelo pré-clínico tumoral.

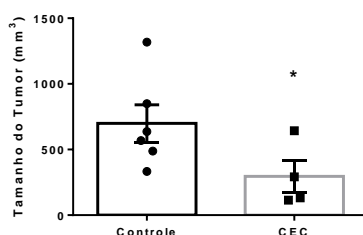


Figura 1. Volume total (mm³) determinado usando o software ImageJ (n = 4-6). Os dados foram analisados pelo teste t de Student. * P<0,05 quando comparado ao grupo controle.

Quanto às análises referentes aos parâmetros de estresse oxidativo (Figura 2), observamos um aumento significativo nos níveis de ROS e diminuição de SH total nos animais que foram submetidos ao implante do tumor, porém o tratamento com extrato de CEC foi capaz de reverter apenas a alteração no ROS. Com relação às enzimas antioxidantes, uma diminuição na atividade da CAT e SOD foi demonstrada no grupo controle, porém o extrato de CEC foi capaz de reestabelecer apenas a atividade da CAT. Não observamos diferença significativa na enzima GST. Uma característica comum a diversos tipos de células cancerosas é o estresse oxidativo, representado por uma formação descontrolada de ROS, que leva ao comprometimento metabólico da célula gerando uma alta malignidade celular e o início da progressão tumoral (ACHARYA et al., 2010). Terapias alvos para o câncer apresentam como um fator de extrema importância a regulação do *status* redox (GORRINI et al., 2013).

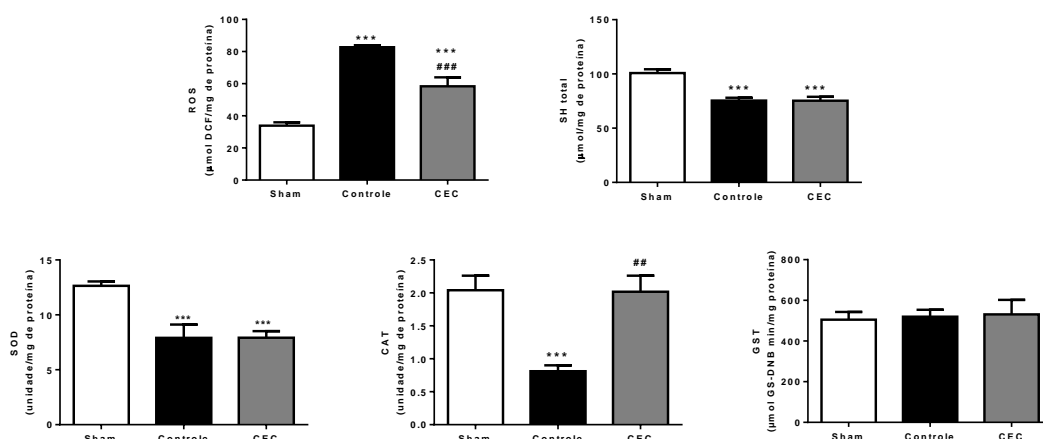


Figura 2. Efeito do tratamento com extrato de *Cecropia pachystachya* (CEC) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), conteúdo tiólico (SH) total e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona-S-transferase (GST) em cérebro de ratos submetidos ao modelo pré-clínico de glioblastoma. (***) P<0,001 comparado com o grupo sham, (##) P<0,01 e (###) P<0,001 comparado com o grupo controle.

4. CONCLUSÕES

O CEC demonstrou ser um relevante alvo para o tratamento do GB, visto que reduziu significativamente o tamanho do tumor, além de reduzir os níveis de ROS e restaurar a atividade da enzima CAT.

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. Catalase in vitro. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, 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, n. 2-3, p. 141-145, 2001.

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.

GAZAL, M. et al. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain research bulletin**, v. 108, p. 10-17, 2014.

GAZAL, M. et al. Preventive effect of *Cecropia pachystachya* against ketamine-induced manic behavior and oxidative stress in rats. **Neurochemical research**, v. 40, n. 7, p. 1421-1430, 2015.

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.

PEDRA, Nathalia Stark et al. Endophytic Fungus Isolated From *Achyrocline satureioides* Exhibits Selective Antiglioma Activity—The Role of Sch-642305. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 476, 2018.

ROCK, Kathy et al. A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme—the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival?. **The British journal of radiology**, v. 85, n. 1017, p. e729-e733, 2012.

THAKKAR, J.P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer epidemiology and prevention biomarkers**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, 2014.