

FUNGO ENDOFÍTICO DE *Achyrocline satureioides*: IMPACTO DE SCH-642305 SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E PROLIFERAÇÃO DE LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA C6

JULIANE TORCHELSSEN SARAIVA¹; NATHALIA STARK PEDRA²; NATÁLIA PONTES BONA³, MAYARA SANDRIELLY SOARES DE AGUIAR⁴, FRANCIELI MORO STEFANELLO⁵; JUCIMARA BALDISSARELLI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – julianetorchelsen@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas– nathaliastark@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – jucimarabaldissarelli@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM), classificado como glioma de grau IV, é o tipo de tumor cerebral mais agressivo do sistema nervoso central, no qual apresenta uma população de células com altas taxas de crescimento, infiltração e resistentes ao tratamento quimioterápico atual (LOUIS et al., 2016). Além disso, o estresse oxidativo trata-se de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas. De forma geral, o excesso de formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um marcador comum do câncer devido vários fatores, que incluem rápida proliferação, metabolismo celular alterado e aberrações genéticas (SHAH; ROGOFF, 2021). Esses problemas ressaltam a importância da busca por alternativas terapêuticas a fim de oferecer uma melhora de vida aos indivíduos acometidos pelo GBM.

Neste sentido, destacam-se os compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário de fungos endofíticos, os quais habitam o interior das plantas e apresentam várias propriedades farmacológicas, particularmente antitumorais (ZHENG et al., 2021). Plantas medicinais da espécie *Achyrocline satureioides* apresentam diversas capacidades terapêuticas, dentre elas atividade antiglioma (SOUZA et al., 2018). De acordo com PEDRA et al. (2018), extratos de fungo endofítico de *A. satureioides* contendo a lactona Sch-642305 reduzem o crescimento e o estresse oxidativo *in vitro* de linhagens de GBM. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da lactona Sch-642305 produzida pelo fungo endofítico de *A. satureioides* sobre a proliferação e parâmetros de estresse oxidativo em linhagem C6 de GBM.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção da lactona Sch-642305 a partir do fungo endofítico de *A. satureioides*

Os micélios do fungo endofítico de *A. satureioides* foram inoculados em meio de cultivo líquido batata-dextrose (BD) e mantidos em estufa a 25 °C por 25 dias (PEDRA et al., 2018). Posteriormente, os compostos produzidos pelo fungo e liberados no meio de cultivo BD foram extraídos com o solvente diclorometano (DCM). O extrato obtido foi fracionado para a obtenção da fração F3 contendo a lactona Sch-642305 de acordo com GALVÃO et al. (2018), sendo a presença deste composto comprovada por meio de análises de cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLUE-MS).

2.2 Cultivo e tratamento de linhagem C6

A linhagem de GBM de rato (C6) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram semeadas em uma densidade de 5×10^3 e 3×10^6 por poço para as análises de citotoxicidade e estresse oxidativo respectivamente, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 15 dias. As culturas foram expostas a lactona Sch-642305 em concentrações crescentes de 0,05 a 10 µg/mL durante 48 h, e células não tratadas foram utilizadas como controle.

2.3 Análise citotóxica

A proliferação celular foi avaliada pela coloração de proteínas celulares através do reagente sulfurodamina B.

2.4 Análise de parâmetros de estresse oxidativo

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (MISRA; FRIDOVICH, 1972), catalase (CAT) (AEBI, 1984) e glutationa peroxidase (GPx) (kit comercial RANSEL®; Randox Lab, Antrim, UK), o conteúdo tiólico total (SH) (AKSENOV; MARKESBERY, 2001) e os níveis intracelulares de EROs (DOS SANTOS et al., 2017) foram mensurados em células C6 expostas a lactona Sch-642305.

2.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão e analisados por ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado na Figura 1, a lactona Sch-642305 reduziu significativamente a proliferação celular nas concentrações de 0,5 a 10 µg/mL sobre a linhagem C6 de GBM quando comparado às células controle. Segundo ADELIN et al. (2011) a lactona Sch-642305 isolada do fungo endofítico do gênero *Phomopsis* sp. exerceu efeito citotóxico sobre as linhagens de carcinoma colorretal humano (HCT-116) e adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231).

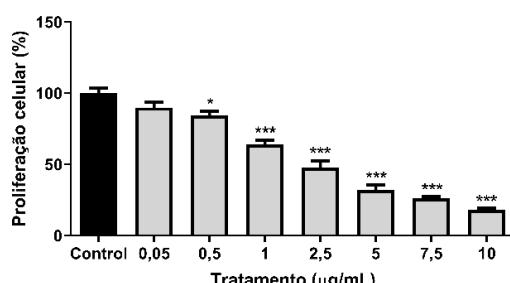


Figura 1. Lactona Sch-642305 de fungo endofítico isolado de *A. Satureioides* reduz a proliferação celular de linhagem C6 após 48 h de tratamento em concentrações crescentes (0,5 a 10 µg/mL). *, **, *** Significativamente diferente do grupo controle ($P < 0,05$ e $P < 0,0001$, respectivamente).

Adicionalmente, pode-se observar que a lactona Sch-642305 reduziu significativamente o estresse oxidativo de forma concentração dependente. Como demonstrado na Figura 2A, a lactona reduziu os níveis intracelulares de EROs em 90% quando comparado ao controle. Além disso, este composto promoveu um aumento no conteúdo SH (Figura 2B) em 97% e na atividade das enzimas antioxidantes SOD (Figura 2C) e CAT (Figura 2D) em 95% e 243%, respectivamente, quando comparado ao controle. Por outro lado, não ocorreram alterações significativas na atividade da GPx, conforme demonstrado na Figura 2E. Conforme relatado por IGHODARO e AKINLOYE (2017), essas enzimas são a primeira linha de defesa contra as EROs, sendo a SOD responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido (O_2^-), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que posteriormente é convertido em água (H_2O) e oxigênio molecular pela ação da enzima CAT. O ânion O_2^- e o H_2O_2 atuam como mitógenos, promovendo a taxa de replicação do DNA e a proliferação em cultivo celular, entretanto as quantidades excessivas desses radicais derivados do oxigênio tornam-se prejudiciais ao organismo. Portanto, o aumento da atividade dessas enzimas indicam que a lactona Sch-642305 apresenta uma grande capacidade antioxidantante frente à linhagem de GBM.

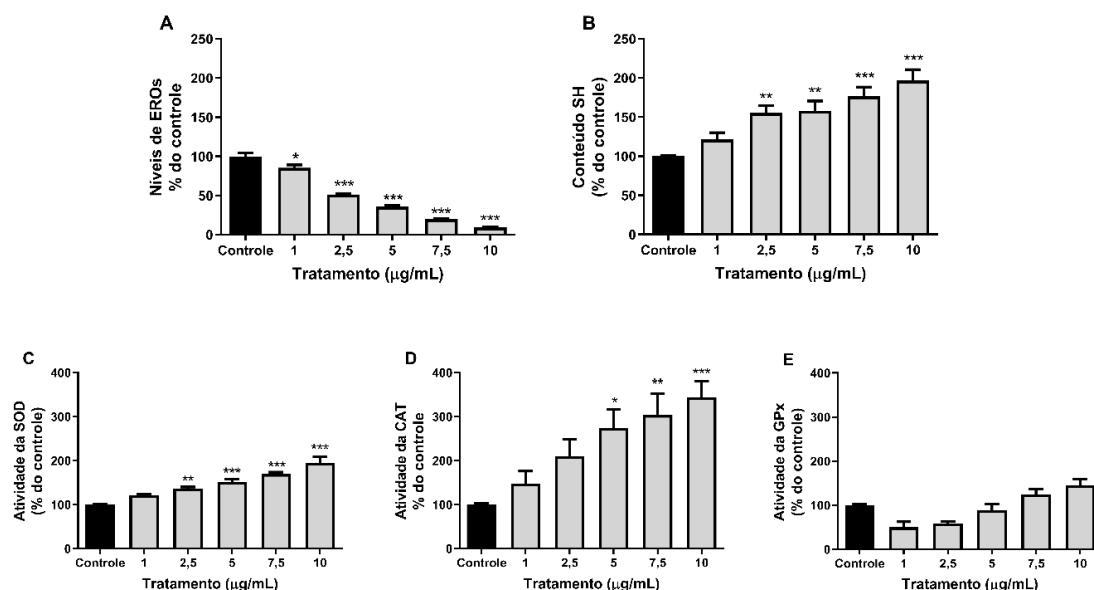


Figura 2. Efeitos da lactona Sch-642305 de fungo endofítico isolado de *A. Satureioides* em parâmetros de estresse oxidativo em linhagem C6. Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (A); conteúdo tiólico total (SH) (B); atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (C), catalase (CAT) (D) e glutationa peroxidase (GPx) (E). *, **, *** Significativamente diferente do grupo controle ($P<0,05$; $P<0,001$ e $P<0,0001$; respectivamente).

4. CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos, observa-se que a lactona Sch-642305, proveniente do metabolismo secundário do fungo endofítico isolado de *A. satureioides*, foi capaz de reduzir a proliferação e modular o *status redox* em linhagem C6. Neste contexto, os metabólitos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos demonstram promissores efeitos antioxidantante e antiproliferativo, tornando-se possíveis componentes do arsenal terapêutico para o GBM.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LÉVAIQUE, H.; MARTIN, M.; RETAILLEAU, P.; OUAZZANI, J. Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2406-2412, 2011.
- 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.
- DOS SANTOS, L. M.; DA SILVA, T. M.; AZAMBUJA, J. H.; RAMOS, P. T.; OLIVEIRA, P. S.; SILVEIRA, E. F; PEDRA, N. S.; GALDINO, K.; DO COUTO, C. A. T.; SOARES, M. S. P.; TAVARES, R. G.; SPANEVELLO, R. M.; STEFANELLO, F. M.; BRAGANHOL, E. Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 424, n. 1-2, p. 69- 78, 2017.
- GALVÃO, W.; BRAZ, R.; CANUTO, K.; RIBEIRO, P.; CAMPOS, A.; MOREIRA, A.; GONÇALVES, N. Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* conservationist proposal for the species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 177-189, 2018.
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. **Alexandria Journal of Medicine**, p. 1-7, 2017.
- LOUIS, D.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; DEIMLING, A.; BRANGER, D.; CAVENEE, W.; OHGAKI, H.; WIESSLER, 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.
- 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.
- PEDRA, N.; GALDINO, K.; DA SILVA, D.; RAMOS, P.; BONA, N.; SOARES, M.; AZAMBUJA, J.; CANUTO, K.; DE BRITO, E.; RIBEIRO, P.; SOUZA, A. S.; CUNICO, W.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R.; BRAGANHOL, E. Endophytic fungus isolated from *Achyrocline satureoides* exhibits selective antiglioma activity - the role of Sch-642305. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 476, 2018.
- SHAH, M.; ROGOFF, H. Implications of reactive oxygen species on cancer formation and its treatment. **Seminars in Oncology**, v. 48, p. 238-245, 2021.
- SOUZA, P.; BIANCHI, S.; FIGUEIRÓ, F.; HEIMFARTHA, L.; MORESCO, K.; GOLÇALVES, R.; HOPPE, J.; KLEIN, C.; SALBEGO, C.; GELAIN, D.; BAS-SANI, V.; ZANOTTO, A.; MOREIRA, C. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureoides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51, p. 23-33, 2018.
- ZHENG, R.; LI, S.; ZHANG, X.; ZHAO, C. Biological Activities of Some New Secondary Metabolites Isolated from Endophytic Fungi: A Review Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 959, 2021.