

## EXTRATO DE *Cecropia pachystachya* MODULA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE GLIOBLASTOMA

NATÁLIA PONTES BONA<sup>1</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>2</sup>; LUIZA SPOHR<sup>3</sup>; FERNANDO LOPEZ ALVEZ<sup>4</sup>; MAYARA SANDRIELLY SOARES DE AGUIAR<sup>5</sup>; FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>6</sup>

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

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

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – fernando.lopez.alvez@hotmail.com

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

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

### 1. INTRODUÇÃO

Os gliomas são tumores cerebrais primários cujas células precursoras apresentam morfologia e expressão semelhante ao tecido glial. Entre eles encontram-se os astrocitomas, oligodendrogliomas e ependiomas (LOUIS et al., 2016). Dentre os gliomas, destaca-se o glioblastoma (GB), caracterizado por ser um astrocitoma primário, sendo o mais comum e agressivo, responsável por mais de 60% de todos os tumores cerebrais em adultos (LEECE et al., 2017).

O tratamento para essa doença 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 (THAKKAR et al., 2014).

Devido ao baixo prognóstico dos pacientes acometidos pelo GB, e a falta de eficiência nos tratamentos disponibilizados, a busca por novos alvos terapêuticos têm ganhado visibilidade frente a comunidade científica. Em especial os extratos de plantas devido as suas ações multialvos e sua baixa toxicidade. Nesse contexto, destaca-se o extrato de *Cecropia pachystachya* (CEC), que apresenta efeitos bem elucidados em doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC) (GAZAL et al., 2014; 2015).

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiglioma do extrato de CEC e seu efeito frente a parâmetros comportamentais em modelo pré-clínico de GB.

### 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 de Federal de Pelotas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética 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.



### **2.3. 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) GB + Veículo, (3) GB + CEC (200 mg/kg/dia). O tratamento foi administrado intragasticamente por 15 dias. Os parâmetros comportamentais foram avaliados no 15º (campo aberto), 16º (reconhecimento de objetos) e 19º dia (labirinto em cruz elevado). 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.

### **2.4. Avaliação dos parâmetros comportamentais**

#### **2.4.1. Campo Aberto**

A atividade locomotora dos animais foi quantificada por meio do teste de campo aberto. O teste foi realizado conforme protocolo previamente descrito (WALSH; CUMMINS, 1976).

#### **2.4.2. Reconhecimento de Objetos**

Este teste foi realizado com o objetivo de avaliar a aprendizagem e memória recentes dos animais, conforme protocolo descrito por DERE et al. (2005).

#### **2.4.3. Labirinto em Cruz Elevado**

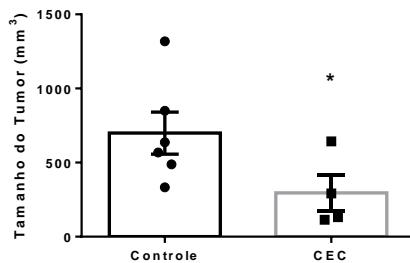
O teste do labirinto em cruz elevado avalia o comportamento do tipo ansiolítico dos animais e foi baseado em ZIGLER et al. (2005).

### **2.4. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média ± erro médio padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste *t* de Student e análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

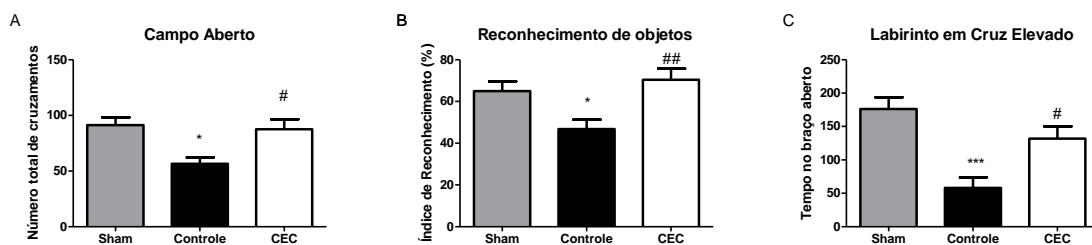
## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com base nos resultados da Figura 1, referentes ao modelo pré-clínico de GB, pode-se evidenciar uma diminuição significativa no tamanho do tumor nos animais que receberam por 15 dias a dose de 200 mg/kg/dia de extrato de CEC (295,1 ± 122,7) quando comparados ao grupo controle, sem tratamento (772,3 ± 149,1). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram o efeito do extrato de CEC *in vitro* em linhagem de glioma.



**Figura 1.** Volume total ( $\text{mm}^3$ ) 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 aos parâmetros comportamentais, pode-se observar no teste do campo aberto, uma diferença significativa entre os grupos quanto ao número total de cruzamentos ( $F(2,34) = 5,98$ ;  $P<0,05$ ), demonstrando que o grupo controle apresentou alteração na locomoção quando comparado ao grupo sham, e que o tratamento com o extrato de CEC foi capaz de reduzir esse comportamento (Figura 2a). No teste de reconhecimento de objetos (Figura 2b) pode-se observar que os animais controle tiveram uma redução no tempo total gasto explorando o objeto novo quando comparados com o grupo sham e que o tratamento com o extrato de CEC foi capaz de reverter esse comportamento ( $F(2,32) = 6,27$ ;  $P<0,05$ ). Em relação ao teste do labirinto em cruz elevado (Figura 2c), nota-se que o grupo controle apresentou redução significativa no número de entradas nos braços abertos do aparelho quando comparado ao grupo sham, considerando um comportamento tipo-ansiolítico neste grupo. O extrato de CEC foi capaz de reverter essa alteração, aumentando o número de entradas nos braços abertos ( $F(2,37) = 10,52$ ;  $P<0,05$ ).



**Figura 2.** Efeitos do tratamento com extrato de *Cecropia pachystachya* (200 mg/kg) nos testes comportamentais em animais submetidos ao modelo de glioma. A atividade locomotora foi analisada por meio do teste do campo aberto (A). A memória não espacial foi analisada por meio do teste de reconhecimento de objetos (B). O comportamento tipo-ansiolítico dos animais foi avaliado pelo teste do labirinto em cruz elevado (C). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n= 10-12$ ). \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  e \*\*\* $P<0,001$  comparados ao grupo controle. # $P<0,05$  e ## $P<0,01$  comparados ao grupo controle.

Em concordância com os resultados obtidos, nosso grupo de pesquisa demonstrou resultados promissores em um modelo pré-clínico de glioma, onde os animais receberam tratamento com o ácido tânico, um composto fenólico que pode ser encontrado em diversos alimentos. Esse composto também demonstrou uma redução significativa no tamanho do tumor (BONA et al., 2020). Está bem descrito

na literatura que pacientes acometidos por GB apresentam uma deterioração neurológica muito rápida, levando a dificuldades cognitivas e alterações comportamentais (Omuro & Deangelis, 2013). No modelo de glioma é possível observar déficits de locomoção e memória, além de um comportamento ansiolítico. No entanto, é importante destacar que o tratamento com extrato de CEC foi capaz de amenizar esses danos.

#### 4. CONCLUSÕES

O extrato de CEC demonstrou ser um promissor alvo para o tratamento do GB, visto que reduziu significativamente o tamanho do tumor, além de reverter as alterações comportamentais evidenciadas nos animais não tratados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONA, Natália 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.

DERE, Ekrem; HUSTON, Joseph P.; SILVA, Maria A. De Souza. Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. **Neurobiology of learning and memory**, v. 84, n. 3, p. 214-221, 2005.

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, Marta 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, Marta 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.

LEECE, R. et al. Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003–2007. **Neuro-oncology**, v. 19, n. 11, p. 1553-1564, 2017.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

OMURO, Antonio; DEANGELIS, Lisa M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **Jama**, v. 310, n. 17, p. 1842-1850, 2013.

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.

WALSH, R. N.; CUMMINS, Robert A. The open-field test: a critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.

ZIEGLER, D. R. et al. Nociception and locomotor activity are increased in ketogenic diet fed rats. **Physiology & behavior**, v. 84, n. 3, p. 421-427, 2005.