

EXTRATO DE AMORA-PRETA MODULA PARÂMETROS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NO ESTABELECIMENTO E PROGRESSÃO DO GLIOBLASTOMA: ESTUDO *IN VITRO* EM LINHAGEM DE RATO C6

LARISSA MENEZES DA SILVEIRA¹; JULIANE TORCHELSEN SARAIVA²; NATHALIA STARK PEDRA³; GIULIA BUENO DE OLIVEIRA DA SILVA⁴; MAYARA SANDRIELLY SOARES DE AGUIAR⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – larissamenezes1999@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – julianetorchelsen@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – giuliadasilvas2002@gmail.com

⁵Universidade Federal do Ceará – mspereirasoares@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GBM) é um tumor extremamente agressivo que afeta o sistema nervoso central (SNC), com incidência mundial baixa, mas que cresce conforme o avançar da idade (HANIF et al., 2017). O GBM é classificado de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) como um glioma astrocítico difuso IDH-tipo selvagem, de grau 4 (CHEN et al., 2022), devido a características como elevada atividade mitótica e capacidade de angiogênese, quimiorresistência, heterogeneidade e padrões infiltrativos (UDDIN et al., 2020).

Atualmente, o GBM conta com uma abordagem terapêutica multimodal, incluindo ressecção cirúrgica, aplicação de radioterapia e quimioterapia com a utilização do fármaco temozolomida (TMZ) (OU et al., 2021). Entretanto, diversas vezes o tratamento convencional se torna ineficaz, uma vez que o GBM comumente adquire resistência ao TMZ devido à alteração na expressão de proteínas alquilantes, enzimas de reparo do DNA e nas vias de sinalização celular (XU et al., 2022).

Assim, a busca por novas alternativas terapêuticas tem sido amplamente investigada. Neste contexto, destacam-se as frutas vermelhas, como a amora-preta (*Rubus sp.*), que apresenta composição rica em variados fitoquímicos do tipo fenólicos os quais lhe conferem elevada atividade biológica, em especial as antocianinas, potentes antioxidantes responsáveis pela cor característica do fruto (COSME et al., 2022). Diversos estudos já relataram o potencial antioxidante e anticancerígeno de compostos polifenólicos derivados de frutas, como o extrato de amora, via mecanismos epigenéticos no câncer colorretal humano (TATAR et al., 2021), efeito antioxidante preventivo em danos associados à neuroinflamação (SOARES et al., 2021) e ainda como moduladores da resposta imune (DOMÍNGUEZ-AVILA et al., 2022). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito do extrato metanólico de amora-preta sobre parâmetros de estresse oxidativo em células da linhagem de glioblastoma 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 CO₂.

2.2 Tratamento com extrato de amora-preta

O extrato de frutos de amora-preta foi preparado utilizando a metodologia descrita por Chaves et al. (2020). Inicialmente, o extrato foi dissolvido em água estéril na concentração de 10000 µg/mL (solução estoque) e então diluído em DMEM com 10% SFB para obter as concentrações de 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL. Após as células de linhagem C6 foram semeadas em placas de 6 poços em uma densidade de 3×10^5 e tratadas com extrato de amora nas concentrações de 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL por 72 h. Células expostas somente ao meio DMEM foram consideradas controle.

2.3 Análise de parâmetros de estresse oxidativo

Após o tratamento com o extrato de amora, as células de glioma C6 foram lavadas 2 vezes com água destilada e o lisado preparado manualmente com o auxílio de um raspador de células. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O pellet descartado e o sobrenadante utilizado para determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

2.4 Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Este método é baseado na oxidação do diacetato de 2,7-dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA) em diclorofluoresceína (DCF), conforme descrito por Ali et al. (1992), usando células intactas.

2.5 Conteúdo total de sulfidril (SH)

O teor de sulfidril foi determinado conforme descrito por Aksenov & Markesbery (2001), usando 5,5'-ditio-bis- (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). Na presença de tióis, o DTNB é reduzido, formando um dissulfeto oxidado e o derivado amarelo TNB. Os resultados são expressos em porcentagem do valor de controle.

2.6 Atividade da glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi analisada em amostras de soro utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, conforme Habig et al. (1974). A atividade de GST foi expressa em porcentagem do valor de controle.

2.7 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada avaliando a inibição da autooxidação da adrenalina dependente de superóxido (Misra & Fridovich, 1972). Os resultados são relatados como uma porcentagem do controle.

2.8 Atividade da catalase (CAT)

Este método é baseado na capacidade do CAT de decompor H₂O₂, que foi monitorada por 3 min (Aebi, 1984). A atividade de CAT foi expressa como uma porcentagem do valor de controle.

2.9 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 \pm erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi observada uma redução na produção de EROS em todas as concentrações testadas, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL, de respectivamente 52,86%, 46,55%, 56,39%, 49,59% e 56,96% quando comparado ao grupo controle (**Figura 1A**). Ainda, observou-se uma elevação do conteúdo total de sulfidrilas nas

concentrações de 1500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$, em 75,62% e 117,62% respectivamente quando comparado ao grupo controle (**Figura 1B**).

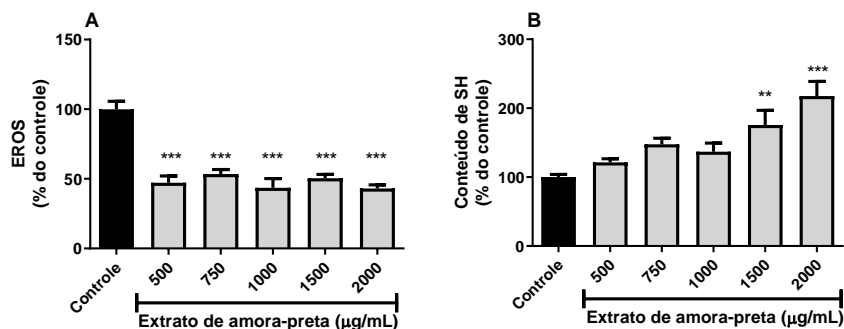


Figura 1. Efeito do tratamento com extrato de amora-preta (500-2000 $\mu\text{g/mL}$) em células de glioma C6, após 72h de exposição. (A) Espécies reativas de oxigênio - EROS; (B) Sulfidrilas - teor de SH. Dados estão expressos com percentagem do controle. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

O nível de EROS é um importante indicador analisado em células cancerígenas, uma vez que já é conhecido seu papel na estabilidade celular, bem como a correlação entre a geração dessas espécies e a progressão tumoral. No GBM, a produção dessas espécies é alta e está correlacionada com alterações no ciclo celular, progressão tumoral e resistência a drogas (OLIVIER et al., 2021). Logo, o controle e redução das EROS em neoplasias já estabelecidas se mostra de grande importância. Por sua vez, a elevação do teor de sulfidrilas é um indicador indireto de estabilidade proteica (TRIVEDI et al., 2009), portanto, sugere-se que o tratamento preserve a funcionalidade de proteínas, como as enzimas, as quais comumente sofrem danos devido à ação das EROS.

Em concordância, ao avaliarmos a atividade de enzimas antioxidantes, observou-se uma elevação de atividade para todas as enzimas testadas nas concentrações de 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$, para a enzima GST em 100,8%, 110,4% e 173,4%, para SOD em 27,36%, 34,71% e 103,7%, e por fim para CAT em 203,4%, 192,2%, e 181,9%, quando comparado ao grupo controle (**Figura 2 A-C**). O aumento da atividade das enzimas antioxidantes possivelmente contribuiu para a diminuição dos níveis de EROS, visto que estas atuam de forma sequencial na inativação dos radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CHENG et al., 2021).

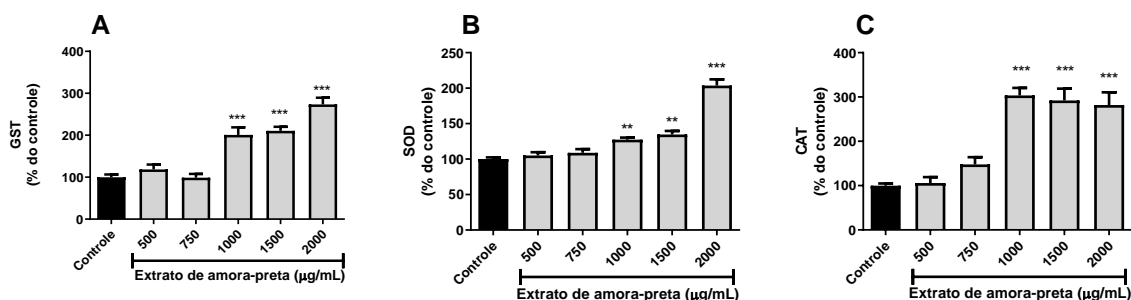


Figura 2. Efeito do tratamento com extrato de amora-preta (500-2000 $\mu\text{g/mL}$) em células de glioma C6, após 72h de exposição. Atividade (A) Glutathione S-transferase – GST; (B) Superóxido dismutase – SOD; (C) Catalase – CAT. Dados estão expressos com percentagem do controle. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, observamos o potencial de interferência do extrato de amora-preta em diferentes parâmetros envolvidos no estabelecimento e progressão do GBM. Tais dados evidenciam as características promissoras do extrato de amora-preta, suportando estudos futuros que aprofundem seus mecanismos de ação e assim amparem sua utilização terapêutica.

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. **Neurosci. Lett**, v. 302, 141–145, 2001.
- ALI, S. et al. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 637- 648, 1992.
- CHAVES, V. C. et al. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. **Neurosci. Lett**, v. 714, 2020.
- CHEN, J. et al. Glioblastoma: Changing concepts in the WHO CNS5 classification. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 65, p. 24–32, 2022.
- CHENG C. M et al. Effects of ciliate infection on the activities of two antioxidant enzymes (SOD and CAT) in captive coral (*goniopora columna*) and evaluation of drug therapy. **Biology**, v. 10, 2021.
- COSME, F. et al. Red Fruits Composition and Their Health Benefits—A Review. **Foods**, v. 11, 2022.
- DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A. et al. Phenolic compounds can induce systemic and central immunomodulation, which result in a neuroprotective effect. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, 2022.
- Habig, W. H. et al. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249, 7130–7139 (1974).
- HANIF, F. et al. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, p. 3–9, 2017.
- 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, p. 3170–3175, 1972.
- OLIVIER, C. et al. Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 2021.
- OU, A. et al. Molecular mechanisms of treatment resistance in glioblastoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 1–24, 2021.
- SOARES, M. S. P. et al. The Protective Action of *Rubus* sp. Fruit Extract Against Oxidative Damage in Mice Exposed to Lipopolysaccharide. **Neurochemical Research**, v. 46, p. 1129–1140, 2021.
- TATAR, M. et al. Epigenetic Effects of Blackberry Extract on Human Colorectal Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 74, p. 1446–1456, 2021.
- TRIVEDI, M. et al. The Role of Thiols and Disulfides on Protein Stability. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, p. 614–625, 2009.
- UDDIN, M. S. et al. Epigenetics of glioblastoma multiforme: From molecular mechanisms to therapeutic approaches. **Seminars in Cancer Biology**, v. 83, p. 100–120, 2020.
- XU, H. et al. GBP3 promotes glioblastoma resistance to temozolomide by enhancing DNA damage repair. **Oncogene**, v. 41, p. 3876–3885, 2022.