

## **EXTRATO DE *PSIDIUM CATTLEIANUM* PROMOVE CITOTOXICIDADE SELETIVA FRENTE A LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA C6**

**JÚLIA ARAÚJO DA SILVA<sup>1</sup>; FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS<sup>2</sup>; JULIANE TORCHELSEN SARAIVA<sup>3</sup> GIULIA BUENO DE OLIVEIRA DA SILVA<sup>4</sup> FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>5</sup> JEAN PIERRE OSÉS<sup>6</sup>**

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

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – tessmerfran@gmail.com

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

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – giuliadasilvas2002@gmail.com

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

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – jean.pierre.oses@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

Neoplasias são descritas como lesões celulares decorrentes de mutações em genes ou proteínas reguladores da divisão e diferenciação celular, desencadeando perda de diferenciação com proliferação anormal, descontrolada e autônoma (FILHO, 2021). Dentre as neoplasias que acometem o sistema nervoso central, destaca-se o glioblastoma (GBM), um tumor cerebral maligno, com elevada prevalência em adultos acima de 45 anos. É classificado pela Organização Mundial da Saúde como glioma difuso grau 4, portanto, extremamente agressivo levando a morte em períodos relativamente curtos na ausência de terapia eficaz (LOUIS et al, 2021).

A alta malignidade do GBM é decorrente de sua heterogeneidade celular e da capacidade de infiltrar e colonizar difusamente o tecido cerebral (VENKATARAMANI et al, 2022). Atualmente, seu tratamento padrão consiste em uma abordagem multimodal com a utilização de recursos como ressecção cirúrgica, radioterapia e administração do quimioterápico padrão temozolomida (JACOB et al, 2020). Entretanto, à sua resistência aos tratamentos, resulta em uma baixa taxa de sobrevida, conferindo a somente 5% dos pacientes diagnosticados uma sobrevida superior a 5 anos (HAMAD et al, 2023).

Dante do exposto, a busca por tratamentos adjuvantes que sejam capazes de reduzir a massa tumoral e melhorar o prognóstico dos pacientes se tornam fundamentais. Os compostos naturais têm se mostrado promissores para o desenvolvimento de novos fármacos devido à sua ampla gama de moléculas e bioativos (HEGDE et al, 2023). O araçá-amarelo (*Psidium cattleianum*), é um fruto nativo do Brasil, que apresenta inúmeras atividades farmacológicas, como propriedades anti-inflamatórias (ELSAYED et al, 2023), antidiabéticas (CARDOSO et al, 2023) e anticancerígenas (MEDINA et al, 2011). Estes efeitos podem ser atribuídos à sua rica composição em compostos fenólicos e flavonoides, conferindo uma elevada capacidade antioxidante (ZANDONÁ et al, 2020).

Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar a seletividade do efeito citotóxico do extrato de *Psidium cattleianum* em células de GBM (C6) através dos ensaios de teste de proliferação celular (SRB) e teste de viabilidade celular (MTT).

### **2. METODOLOGIA**

#### **2.1 Cultivo de glioma C6 e fibroblastos L929**

As células de rato de glioma (C6) e de fibroblastos (L929) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, EUA). As mesmas

foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir confluência desejada, as células foram semeadas em placas de 96 poços com densidade de 5x10<sup>3</sup> por poço.

### **2.2 Tratamento com extrato hidroalcoólico de *Psidium cattleianum***

O extrato foi preparado utilizando a metodologia descrita por Ramos *et al.* (2020), com pequenas modificações. Inicialmente, uma solução estoque foi preparada com concentração de 10000 µg/mL a partir da dissolução do extrato em água estéril com posterior diluição em DMEM com 10% SFB para obtenção das concentrações de 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL. Em seguida, as placas foram tratadas nas concentrações descritas acima durante 48h. Células expostas somente ao meio DMEM foram consideradas controle.

### **2.3 Teste de proliferação celular (SRB) e viabilidade celular (MTT)**

A proliferação celular foi determinada por ensaio colorimétrico de Sulforodamina B (SRB) de acordo com metodologia previamente descrita por Pauwels *et al.* (2003). Já a viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium] (MTT) de acordo com metodologia proposta por Mosmann (1983).

### **2.4 Análise estatística**

Os dados foram analisados em triplicata, utilizando o software GraphPad Prism 9. As análises foram feitas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de *post-hoc* de Tukey, onde foram considerados significativos quando *P*<0,05.

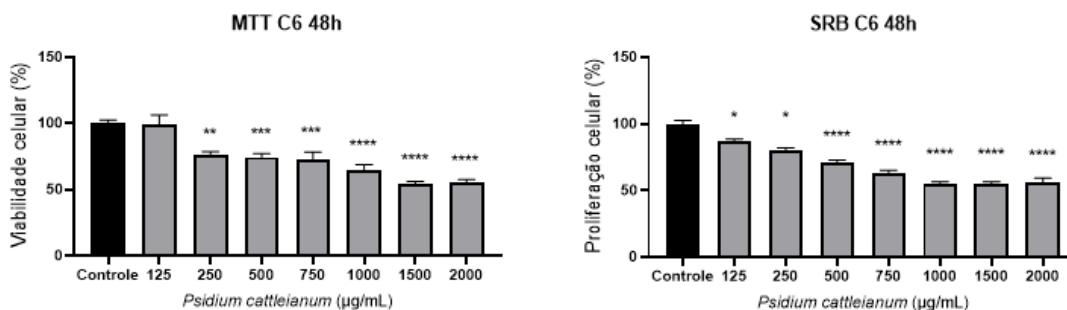
## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Conforme evidenciado na Figura 1, o extrato de araçá apresentou efeitos citotóxico para as células de C6, sendo eficaz na redução da viabilidade celular e proliferação desta linhagem. Nos protocolos experimentais no ensaio de MTT, utilizado para avaliar a viabilidade celular, as concentrações de 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL do extrato de *Psidium cattleianum*, promoveram uma redução estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle. Posteriormente, nos protocolos experimentais do ensaio de SRB, as concentrações testadas (125 a 2000 µg/mL) apresentaram redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

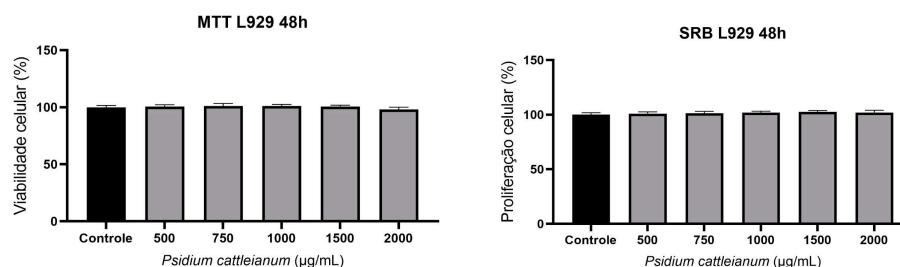
Por outro lado, foi possível verificar que a faixa de concentrações testadas (500 a 2000 µg/mL) não foi capaz de reduzir de maneira significativa a viabilidade e a proliferação da linhagem celular de fibroblastos (Figura 2).

Os resultados encontrados estão em concordância com outros estudos. MEDINA e colaboradores (2011) demonstraram que o extrato foi capaz de reduzir a viabilidade de linhagens cancerígenas de mama (MCF-7) e cólon (Caco-2), sem apresentar citotoxicidade em células saudáveis de fibroblastos embrionários.

A análise de caracterização química do extrato de *Psidium cattleianum*, realizada previamente, demonstrou que o mesmo é rico em compostos fenólicos, majoritariamente de ácido gálico, catequinas e ácido elágico (dados não publicados). O desbalanço redox tem sido descrito por contribuir significativamente para o desenvolvimento e progressão dos gliomas. Os compostos presentes no extrato, com sua elevada capacidade antioxidante, podem atuar na redução desse estresse (ZHOU, 2020). Assim, a alta capacidade antioxidante destes compostos poderia modular esse desbalanço, oferecendo um potencial terapêutico.



**Figura 1.** Análise de citotoxicidade após tratamento de 48h com extrato de *Psidium cattleianum*, sobre a linhagem C6 com concentrações crescentes (125 a 2000  $\mu\text{g/mL}$ ). \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  e \*\*\*\* $P<0,0001$  indicam níveis de significância quando comparado ao grupo controle. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média. Os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 2.** Análise de citotoxicidade após tratamento de 48h com extrato de *Psidium cattleianum*, sobre a linhagem L929 com concentrações crescentes (500 a 2000  $\mu\text{g/mL}$ ). \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  e \*\*\*\* $P<0,0001$  indicam níveis de significância quando comparado ao grupo controle. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Embora o mecanismo de ação do extrato de *Psidium cattleianum* não esteja ainda descrito na literatura, os bioativos presentes no mesmo já vêm sendo isoladamente estudados. Cetim et al. (2020) descreveu que o ácido elágico promoveu a inibição da expressão da enzima MGMT, sugerindo que seu efeito antiproliferativo altera o mecanismo de reparo do DNA em linhagens de C6, e assim, levando a morte celular. Além disso, Xia et al. (2023) demonstraram que catequinas se ligam fortemente e inibem a proteína KEDLR2, responsável pela progressão do GBM. Ainda, um estudo realizado por Pedra et al. (2022) identificou que o ácido gálico reduziu significativamente o desbalanço redox do microambiente tumoral e assim, impediu diretamente a progressão do tumor *in vitro* e em um modelo pré-clínico de glioblastoma. Desta forma, é possível postular a hipótese de que a eficiência do extrato pode ser em virtude da ação sinérgica dos diferentes compostos presentes no mesmo, envolvendo diversos mecanismos de ação.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que o extrato de *Psidium cattleianum* pode apresentar potencial efeito antineoplásico sobre a linhagem celular de GBM, evidenciando uma seletividade para as células tumorais. Emergindo como um promissor candidato para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas adjuvantes para esta patologia. No entanto, na continuidade deste projeto, há a necessidade de realização de abordagens adicionais para uma melhor compreensão de mecanismos envolvidos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDOSO, J.S et al. Psidium cattleianum fruit extract prevents systemic alterations in an animal model of type 2 diabetes mellitus: comparison with metformin effects. **Biomarkers**, v. 28, n. 2, p. 238-248, 2023.
- CETIN, A. et al. Ellagic acid enhances antitumor efficacy of temozolomide in an in vitro glioblastoma model. **Turk Neurosurg**, v. 30, n. 6, p. 813-821, 2020.
- ELSAYED, H.E. et al. Essential oils of Psidium cattleianum Sabine leaves and flowers: Anti-inflammatory and cytotoxic activities. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, p. 1120432, 2023.
- FILHO, G.B. **Bogliolo - Patologia**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2021. Cap. 10 p. 225-283.
- HAMAD, A. et al. Recent developments in glioblastoma therapy: oncolytic viruses and emerging future strategies. **Viruses**. 2023; 15 (2): 547.
- HEGDE, M. et al. Natural compounds targeting nuclear receptors for effective cancer therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 42, n. 3, p. 765-822, 2023.
- HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007.
- JACOB, F. et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter-and intra-tumoral heterogeneity. **Cell**, v. 180, n. 1, p. 188-204.e22, 2020.
- LOUIS, D.N. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Neuro-oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.
- MEDINA, A. L. et al. Araçá (Psidium cattleianum Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, p. 916–922, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- PEDRA, N.S. et al. Impact of gallic acid on tumor suppression: Modulation of redox homeostasis and purinergic response in *in vitro* and a preclinical glioblastoma model. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 110, p. 109156, 2022.
- RAMOS, V. P. et al. Hypolipidemic and anti-inflammatory properties of phenolic rich Butia odorata fruit extract: potential involvement of paraoxonase activity. **Biomarkers**, v. 25, p. 417-424, 2020.
- VENKATARAMANI, V. et al. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. **Cell**, v. 185, n. 16, p. 2899-2917.e31, 2022.
- XIA, F. et al. Chinese herb related molecules Catechins, Caudatin and Cucurbitacin-I inhibit the proliferation of glioblastoma by activating KDELR2-mediated endoplasmic reticulum stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 687, p. 149196, 2023.
- ZANDONÁ, G.P. et al. Extraction and characterization of phytochemical compounds from araçazeiro (Psidium cattleianum) leaf: Putative antioxidant and antimicrobial properties. **Food Research International**, v. 137, p. 109573, 2020.
- ZHOU, Y. et al. Potential implications of hydrogen peroxide in the pathogenesis and therapeutic strategies of gliomas. **Archives of pharmacal research**, v. 43, p. 187-203, 2020.