

MODULAÇÃO DA HOMEOSTASE REDOX PELO ÁCIDO TÂNICO NANOENCAPSULADO EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA DE RATO C6

WILLIAM SANABRIA SIMÕES¹; FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS²;
NATHALIA STARK PEDRA³, NATÁLIA PONTES BONA⁴, KARINA PEREIRA
LUDUVICO⁵, FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – williamsimoes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – tessmerfran@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – karina_luduvico@outlook.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os gliomas, neoplasias originadas das células gliais, constituem a forma mais prevalente de tumores do sistema nervoso central. Entre eles, destaca-se o glioblastoma do tipo IDH-selvagem (GBM), reconhecido pela alta agressividade e predominância, apresentando uma taxa de sobrevida em cinco anos de somente 4,6% (TERAIYA *et al.*, 2023). Essa baixa taxa é atribuída à sua natureza infiltrativa, que impossibilita a ressecção completa do tumor, além da resistência aos tratamentos, especialmente à temozolomida, resultando em um prognóstico desfavorável (IYER *et al.*, 2023).

Dada a relevância do estresse oxidativo na gliomagênese, há um crescente interesse na exploração de compostos naturais com propriedades antioxidantes (PERSANO, GIGLI & LEPORATTI, 2022), como o ácido tânico (AT). Este composto é reconhecido por suas propriedades antioxidantes (MEINE *et al.* 2020), neuroprotetoras (LUDUVICO *et al.*, 2020) e antitumorais (BONA *et al.*, 2022) em modelos experimentais. Contudo, sua aplicação clínica é limitada por fatores como a baixa permeabilidade da barreira hematoencefálica e biodisponibilidade, que comprometem a sua eficácia terapêutica (MARTINELLI *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o desenvolvimento de nanocápsulas surge como uma estratégia promissora para otimizar a entrega de compostos bioativos (YOUNESS *et al.*, 2021), especialmente as revestidas com zeína (ZN). Essas nanocápsulas permitem a liberação controlada de moléculas e facilitam o transporte pela barreira hematoencefálica (MUHAMMAD *et al.*, 2022). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos das nanocápsulas de AT revestidas com ZN produzidas pela técnica de *electrospraying* na modulação dos parâmetros de estresse oxidativo em linhagem de GBM de rato (C6).

2. METODOLOGIA

2.1 Produção de nanocápsulas

A nanoencapsulação do AT foi realizada por meio da técnica de *electrospraying*, conforme método descrito por RADÜNZ *et al.* (2020) utilizando a ZN com material de revestimento. A solução polimérica foi preparada utilizando concentração de 9% de ZN (p/v) em solução de etanol/água na proporção de 70:30 (v/v), incorporando 1,5% (p/p) de AT. Simultaneamente, nanocápsulas controle foram preparadas sob as mesmas condições experimentais, porém constituídas exclusivamente de ZN, sem a adição de AT (LUDUVICO *et al.*, 2024).

2.2 Cultura celular

As células de glioma de rato (C6) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram semeadas a uma densidade de 3×10^5 células/poço em placas de 6 poços e incubadas sob condições ideais de cultivo celular. As

culturas foram expostas por 72 horas às concentrações de 125, 150 e 175 µg/mL de nanocápsulas de AT revestidas com ZN (NC-AT/ZN), 175 µg/mL de nanocápsulas de ZN sem AT (NC-ZN) e 175 µg/mL de AT isolado (AT). Células não tratadas foram consideradas como controle (CT).

2.3 Análise dos parâmetros de estresse oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada utilizando células intactas, conforme descrito por Ali *et al.* (1992). O conteúdo total de sulfidrilas (SH) foi determinado segundo metodologia proposta por Aksenov & Markesberry (2001). Além disso, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram avaliadas de acordo com Misra & Fridovich (1972) e Aebi (1984), respectivamente.

2.4 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão da média e foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey usando o software GraphPad Prism 9.5. Valores estatisticamente significativos foram considerados quando $P<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, as células expostas ao AT isolado apresentaram uma redução significativa de 47,80% na produção de EROs em comparação ao grupo CT. Por outro lado, as NC-AT/ZN nas concentrações de 125, 150 e 175 µg/mL resultaram em reduções dependentes da concentração de 46,70%, 64,73% e 79,02%, respectivamente, em relação ao grupo CT (**Figura 1A**). Adicionalmente, observou-se um aumento de 66,97% no conteúdo total de SH no grupo tratado com NC-ZN. Em contrapartida, as NC-AT/ZN exibiram aumento mais expressivo de 72,72% em 150 µg/mL e 97,37% em 175 µg/mL, em comparação ao grupo CT (**Figura 1B**).

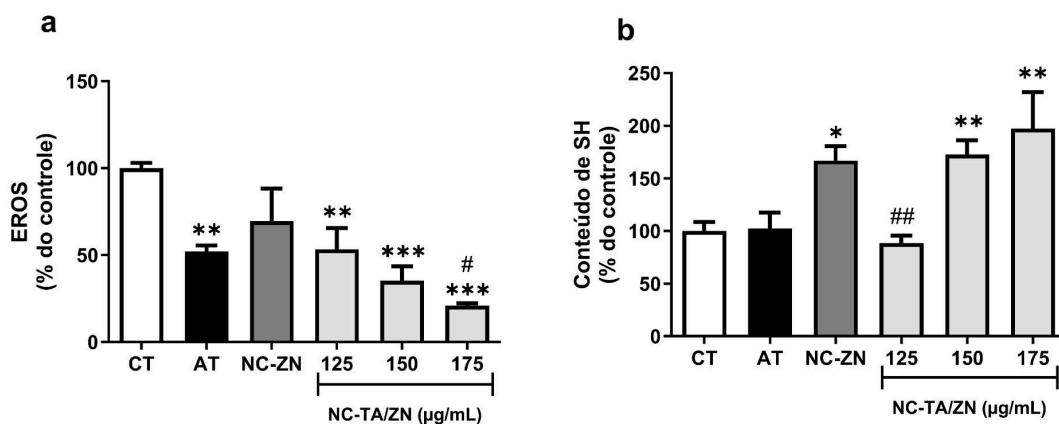


Figura 1. Efeitos do tratamento com NC-AT/ZN, NC-ZN e AT isolado em células de glioma C6 após 72 horas. **(A)** Espécies reativas de oxigênio (EROs); **(B)** Conteúdo total de sulfidrilas (SH). Os dados foram expressos como porcentagens do valor do CT. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ em comparação com grupo CT e # $P<0,05$; ## $P<0,01$ em comparação com o grupo ZN.

A reversão do aumento das EROs e da redução do conteúdo de grupos SH são de extrema importância no contexto do GBM, uma vez que estão relacionados à progressão e a resistência à terapia (OLIVIER *et al.*, 2020). A modulação dos níveis de EROs pode mitigar o estresse oxidativo, minimizando danos celulares e apoptose, o que pode aumentar a eficácia dos tratamentos (ARFIN *et al.*, 2021). Adicionalmente, a restauração dos grupos SH pode fortalecer as defesas celulares e promover um ambiente *redox* equilibrado

(ULRICH & JAKOB, 2019). Logo, sugere-se que o tratamento com as NC-AT/ZN é capaz de minimizar os efeitos deletérios associados ao estresse oxidativo.

Em relação à atividade das enzimas antioxidantes, todos os grupos testados apresentaram um aumento significativo na atividade da SOD em comparação ao grupo CT. Especificamente, no grupo NC-AT/ZN, observou-se o aumento de 117,7%, 147,4% e 118% nas concentrações de 125, 150 e 175 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 2A). Além disso, a concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ do grupo NC-AT/ZN resultou em um aumento de 287,6% na atividade da CAT, enquanto o grupo AT apresentou um aumento de 314,2% em comparação ao CT (Figura 2B).

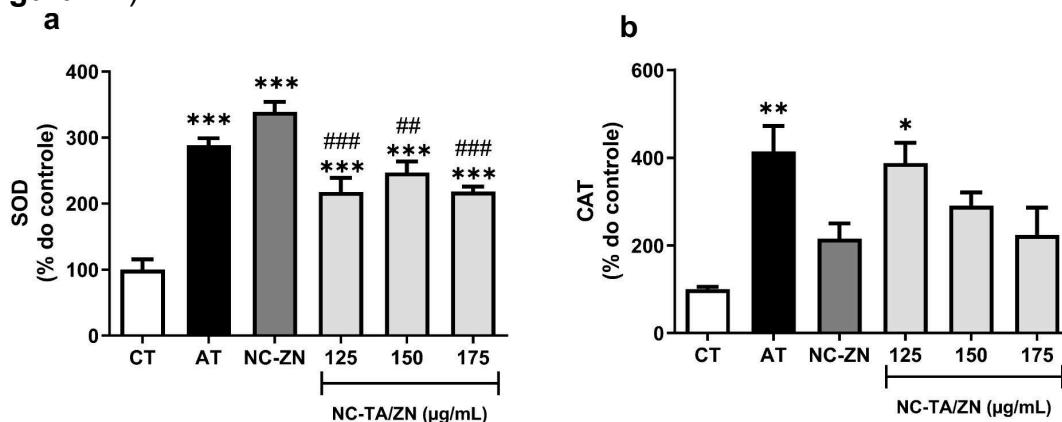


Figura 2. Efeitos do tratamento com NC-AT/ZN, NC-ZN e AT isolado em células de glioma C6 após 72 horas. Atividade da (A) Superóxido dismutase (SOD) e (B) Catalase (CAT). Os dados foram expressos como porcentagens do valor do CT. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ em comparação com grupo CT e ## $P<0,01$; ### $P<0,001$ em comparação com o grupo ZN.

O aumento da atividade antioxidante das enzimas SOD e CAT pode ser atribuído à presença de grupos hidroxilas na estrutura do AT, que mitigam danos causados por radicais livres (GÜLÇİN *et al.*, 2010). A ZN também apresenta efeitos antioxidantes devido à presença de aminoácidos hidrofóbicos, que neutralizam radicais livres (DÍAZ-GÓMEZ *et al.*, 2020). Observou-se ainda que a atividade da CAT apresentou resposta mais eficaz na menor concentração testada, sugerindo uma resposta bifásica das enzimas antioxidantes às NC-TA/ZN, na qual concentrações menores podem induzir regulação positiva dos mecanismos de defesa antioxidante (BAER-DUBOWSKA *et al.*, 2020).

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos evidenciam os efeitos sinérgicos do AT e da ZN na modulação de alguns parâmetros de estresse oxidativo, impactando a progressão e resistência do GBM. Tais resultados sugerem que compostos naturais nanoencapsulados podem ser explorados como terapias adjuvantes, ressaltando a necessidade de pesquisas adicionais sobre os mecanismos das NC-AT/ZN na morte celular anti-glioma.

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. *Neuroscience Letters*, 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.
 ARFIN, S., JHA, N. K., JHA, S. K., *et al.* Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants*, v. 10, n. 642, 2021.

BAER-DUBOWSKA, W., SZAEFER, H., MAJCHRZAK-CELIŃSKA, A., et al. Tannic Acid: Specific Form of Tannins in Cancer Chemoprevention and Therapy-Old and New Applications. **Current Pharmacology Reports**, v. 6, p. 28–37, 2022.

BONA, N. P., SOARES, M. S. P., PEDRA, N. S., et al. Tannic Acid Attenuates Peripheral and Brain Changes in a Preclinical Rat Model of Glioblastoma by Modulating Oxidative Stress and Purinergic Signaling. **Neurochemical Research**, v. 47, n. 6, p. 1541–1552, 2022.

DÍAZ-GÓMEZ, J. L., NEUNDORF, I., LÓPEZ-CASTILLO, L. M., et al. In Silico Analysis and In Vitro Characterization of the Bioactive Profile of Three Novel Peptides Identified from 19 kDa α -Zein Sequences of Maize. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5405, 2020.

GÜLÇİN, İ., HUYUT, Z., ELMASTAŞ, M., et al.. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry**, 3(1), 43–53, 2010.

IYER, K., SAINI, S., BHADRA, S., et al. Precision medicine advancements in glioblastoma: A systematic review. **BioMedicine**, v. 13, n. 2, p. 1–13, 2023.

LUDUVICO, K. P., SPOHR, L., SOARES, M. S. P., et al. Antidepressant Effect and Modulation of the Redox System Mediated by Tannic Acid on Lipopolysaccharide-Induced Depressive and Inflammatory Changes in Mice. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 9, p. 2032–2043, 2020.

LUDUVICO, K.P., RADÜNZ, M., HACKBART, H.C.D.S. et al. Electrospraying and electrospinning of tannic acid-loaded zein: Characterization and antioxidant effects in astrocyte culture exposed to *E. coli* lipopolysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 267, n. 131433, 2024.

MARTINELLI, C., PUCCI, C., BATTAGLINI, M., et al. Antioxidants and Nanotechnology: Promises and Limits of Potentially Disruptive Approaches in the Treatment of Central Nervous System Diseases. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 3, p. e1901589, 2020.

MEINE, B. M., BONA, N. P., LUDUVICO, K. P., et al. (2020). Ameliorative effect of tannic acid on hypermethioninemia-induced oxidative and nitrosative damage in rats: Biochemical-based evidence in liver, kidney, brain, and serum. **Amino Acids**, v. 52, n. 11–12, p. 1545–1558, 2020.

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.

MUHAMMAD, P., HANIF, S., LI, J., et al. Carbon dots supported single Fe atom nanozyme for drug-resistant glioblastoma therapy by activating autophagy-lysosome pathway. **Nano Today**, v. 45, n. 101530, 2022.

OLIVIER, C. et al. Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 2021.

PERSANO, F., GIGLI, G., & LEPORATTI, S. Natural Compounds as Promising Adjuvant Agents in The Treatment of Gliomas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3360, 2022.

RADÜNZ, M., HACKBART, H.C.D.S., BONA, N. P. et al. Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 192, n. 111020, 2020.

TERAIYA, M., PERREAUDET, H., & CHEN, V. C. (2023). An overview of glioblastoma multiforme and temozolomide resistance: Can LC-MS-based proteomics reveal the fundamental mechanism of temozolomide resistance? **Frontiers in Oncology**, v. 13, n. 1166207, 2023.

ULRICH, K., & JAKOB, U. The role of thiols in antioxidant systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 140, p. 14–27, 2019.

YOUNESS, R. A., KAMEL, R., ELKASABGY, N. A., et al. Recent Advances in Tannic Acid (Gallotannin) Anticancer Activities and Drug Delivery Systems for Efficacy Improvement. A Comprehensive Review. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1486, 2021.