

Cecropia pachystachya*: um importante agente antiglioma *in vitro* e *in vivo

FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS¹; NATÁLIA PONTES BONA²; NATHALIA STARK PEDRA³; LUIZA SPOHR⁴; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – tessmerfran@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Gliomas são tumores oriundos das células da glia, são classificados em quatro graus, sendo os gliomas de grau IV, como o glioblastoma (GB), os que apresentam maior agressividade e, conseqüentemente, o pior prognóstico (LOUIS et al., 2016). A alta capacidade infiltrativa, angiogênica, bem como a resistência às terapias convencionais, confere aos pacientes acometidos pelo GB uma sobrevida média de apenas 14 a 20 meses (STUPP et al., 2017). Diante disso, mostra-se necessária a investigação de alternativas terapêuticas para o combate ao GB.

Neste propósito, os produtos naturais são considerados alvos promissores, sendo importantes fontes de compostos bioativos, conferindo a eles propriedades antitumorais bem descritas (ZOU et al., 2021). Dentre esses, destaca-se o extrato de *Cecropia pachystachya* (CEC), cujos relatos na literatura descrevem efeitos farmacológicos relevantes no combate ao câncer, como ação anti-inflamatória, antioxidante e citotóxica (ARAGÃO et al., 2013; GAZAL et al., 2014).

Diante do exposto, esse trabalho visa avaliar o efeito antitumoral do CEC *in vitro* e em modelo pré-clínico de GB.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da instituição, sob o número de protocolo CEEA 31292-2018.

2.2. Preparo do extrato

O extrato de folhas de *Cecropia pachystachya* foi preparado pelo método de infusão aquosa, segundo Gazal et al. (2014). A secagem foi feita por spray dryer sob as condições de: temperatura de entrada: 160 °C; temperatura de saída: 111 °C; fluxo de alimentação: 5%; fluxo de ar: 100%; diâmetro do atomizador 0,7 mm. Posteriormente, o extrato bruto seco foi armazenado em freezer a -20 °C.

2.4. Protocolo *in vitro*

A linhagem de glioma C6 (rato) foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC), cultivada em meio DMEM e suplementada com 10% de soro fetal bovino. As células foram semeadas em placas de 96 poços em densidade de

5×10^3 células por poço e mantidas sob condições padrões de cultivo celular (5% CO₂, a 37 °C e atmosfera umidificada). O tratamento com CEC foi efetuado nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL. Células não tratadas foram utilizadas como controle. A viabilidade celular foi avaliada mediante ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) conforme reportado por MOSMMAN (1983), o qual baseia-se na determinação de células metabolicamente viáveis.

2.4. Protocolo *in vivo*

Para o modelo pré-clínico de GB, os animais foram previamente anestesiados com administração intraperitoneal de cetamina e xilazina, e as células C6 foram ressuspensas em meio DMEM e injetadas (3 µL) no estriado dos animais (coordenadas em relação ao bregma: 3,0 mm lateral, 0,5 posterior e 6 mm de profundidade). Cinco dias após o implante intracerebroventricular os animais foram divididos em três grupos: (1) *Sham*, (2) GB + Veículo, (3) GB + CEC (200 mg/kg/dia). O tratamento foi administrado durante 15 dias pela via intragástrica. 21 dias após a implantação do glioma, os animais foram eutanasiados e os cérebros foram removidos, seccionados e fixados em formalina para posteriores análises. Seções diferentes do cérebro de cada animal foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para subsequente quantificação do tamanho do tumor, utilizando um microscópio conectado a uma câmera. A área do tumor (mm²) foi quantificada utilizando o software ImageJ. O volume total do tumor (mm³) foi calculado multiplicando a seção da fatia e adicionando a área segmentada.

2.4. Análise estatística

Os dados foram analisados em triplicata utilizando a ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey e teste t de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação a investigação *in vitro*, observou-se que no tratamento com CEC durante 24 horas houve redução significativa da viabilidade celular dos gliomas (Figura 1A), com redução de 24% na concentração de 200 µg/mL e 56% na concentração de 500 µg/mL. Com o tratamento durante o período de 48 e 72 horas observou-se redução na viabilidade celular a partir da concentração de 100 µg/mL, com redução de 36% e 25%, respectivamente (Figuras 1B-C). Nas maiores concentrações a redução da viabilidade celular variou de 60 a 66% (Figuras 1B-C). Esses resultados demonstram que o CEC apresentou efeito citotóxico frente a linhagem de GB C6 de modo concentração-dependente.

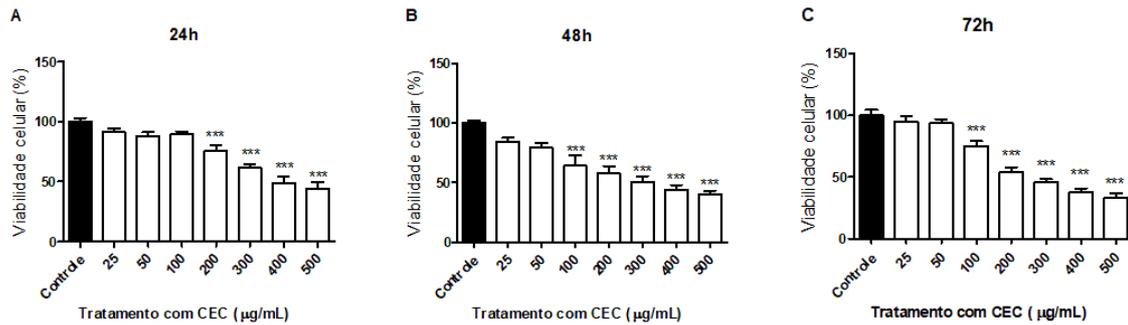


Figura 1. Análise citotóxica do extrato aquoso de *Cecropia pachystachya* (CEC), nos tempos de 24, 48 e 72h, sobre linhagem de glioblastoma C6. Dados expressos como média \pm erro padrão, analisados por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0,05$ (***)

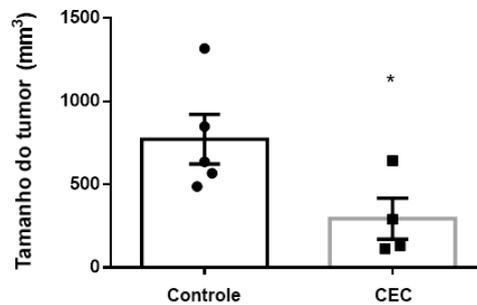


Figura 2. Análise do tamanho do tumor. Volume total em mm^3 determinado usando o software ImageJ ($n = 4-5$). Os dados foram analisados pelo teste t de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0,05$ (*).

Os resultados foram também promissores no protocolo *in vivo*, onde o tratamento com CEC reduziu aproximadamente 62% no tamanho do tumor. Até o presente momento, não há relatos na literatura avaliando o efeito antitumoral de CEC sobre modelo pré-clínico de GB. Seu efeito sobre linhagens de GB também é pouco explorado, no entanto, outros tipos de extratos de *Cecropia pachystachya* demonstraram efeito citotóxico frente a linhagem de leucemia e câncer de próstata (ARAGÃO et al., 2013; ROSA et al., 2020). Além disso, CEC possui em sua composição isoorientina e ácido clorogênico, compostos cujos efeitos citotóxicos foram demonstrados em diferentes linhagens celulares (XU et al., 2020), tendo o ácido clorogênico demonstrado esse efeito em linhagem de GB (XUE et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

O presente estudo é o primeiro a relatar o efeito antitumoral de CEC sobre modelo pré-clínico de GB. Esse efeito foi observado tanto *in vitro* e *in vivo* por meio da redução da viabilidade celular de linhagem de glioma C6, bem como induzindo significativa redução do tamanho do tumor de animais submetidos ao modelo pré-clínico de GB. Somados, os resultados sugerem que CEC é um promissor alvo de pesquisa como possível integrante no arsenal terapêutico frente ao GB.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, D.M.; LIMA, I.V.; DA SILVA, J.M.; BELLOZI, P.M.; DA COSTA, J.D.E.C.; CARDOSO, G.M.; DE SOUZA-FAGUNDES, E.M.; SCIO, E. Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 926-930, 2013.

GAZAL, M.; ORTMANN, C.F.; MARTINS, F.A.; STRECK, E.L.; QUEVEDO, J.; DE CAMPOS, A.M.; STEFANELLO, F.M.; KASTER, M.P.; GHISLENI, G.; REGINATTO, F.H.; LENCINA, C.L. 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.

LOUIS, D.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; DEIMLING, A.; BRANGER, D.; CAVENEE, W.; OHGAKI, H.; WIESTLER, 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.

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.

ROSA, H.H.; CARVALHO, P.; ORTMANN, C.F.; SCHNEIDER, N.F.Z.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M.O.; SILVA, I.T. Cytotoxic effects of a triterpene-enriched fraction of *Cecropia pachystachya* on the human hormone-refractory prostate cancer PC3 cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110551, 2020.

STUPP, R. et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 318, p. 2306-2316, 2017.

XU, W.T.; SHEN, G.N.; LI, T.Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, T.; XUE, H.; ZUO, W.B.; LI, Y.N.; ZHANG, D.J.; JIN, C.H. Isoorientin induces the apoptosis and cell cycle arrest of A549 human lung cancer cells via the ROS-regulated MAPK, STAT3 and NF- κ B signaling pathways. **International Journal of Oncology**, v. 57, p. 550-561, 2020.

XUE, N.; ZHOU, Q.; JI, M.; JIN, J.; LAI, F.; CHEN, J.; ZHANG, M.; JIA, J.; YANG, H.; ZHANG, J.; LI, W.; JIANG, J.; CHEN, X. Chlorogenic acid inhibits glioblastoma growth through repolarizing macrophage from M2 to M1 phenotype. **Scientific Reports**, v. 3, p. 39011, 2017.

ZOU, H.; LI, Y.; LIU, X.; WU, Z.; LI, J.; MA, Z. Roles of plant-derived bioactive compounds and related microRNAs in cancer therapy. **Phytotherapy Research**, v. 35, p. 1176-1186, 2021.