

## FUNGO ENDOFÍTICO DE *Achyrocline satureioides*: IMPACTO DE SCH-642305 SOBRE A VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E SOBREVIDA CLONOGÊNICA DE LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME C6

JULIANE TORCHELSEN SARAIVA<sup>1</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>2</sup>; NATÁLIA PONTES BONA<sup>3</sup>; KIRLEY MARQUES CANUTO<sup>4</sup>; FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>5</sup>, ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

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

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

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

<sup>4</sup>Embrapa Agroindústria Tropical – kirley.canuto@embrapa.br

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

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

### 1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM), classificado como glioma de grau IV, é o tumor cerebral mais agressivo do sistema nervoso central. O GBM é composto por uma população heterogênea de células altamente infiltrativas, angiogênicas e resistentes ao tratamento quimioterápico (LOUIS et al., 2016). Considerando que os pacientes com GBM possuem uma sobrevida média de apenas 14 meses (STAVROVSKAYA et al., 2016), torna-se necessária a busca por alternativas terapêuticas a fim de melhorar o baixo prognóstico e reduzir a recorrência do tumor.

Neste sentido, destacam-se os compostos bioativos oriundos do metabolismo secundário de fungos endofíticos, os quais habitam o interior das plantas e apresentam múltiplas propriedades farmacológicas, especialmente antitumorais (ZHENG et al., 2021). Plantas medicinais da espécie *Achyrocline satureioides*, popularmente conhecidas como ‘marcela’, apresentam diversas capacidades terapêuticas, inclusive atividade antiglioma (SOUZA et al., 2018). Segundo PEDRA et al. (2018), extratos de fungo endofítico de *A. satureioides* contendo a lactona Sch-642305 reduzem o crescimento *in vitro* de linhagens de GBM, entretanto não há estudos descrevendo se tais efeitos são atribuídos à lactona ou aos demais compostos presentes nesses extratos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos fracionados contendo ou não a lactona produzida pelo fungo endofítico de *A. satureioides* sobre a viabilidade, proliferação e sobrevida clonogênica em linhagem C6 de GBM.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Obtenção dos extratos fracionados de fungo endofítico de *A. satureioides*

Os micélios do fungo endofítico de *A. satureioides* foram inoculados em meio de cultivo líquido batata-dextrose (BD) e mantidos em estufa a 25°C por 25 dias (PEDRA et al., 2018). Após, os compostos produzidos pelo fungo e liberados no meio de cultivo BD foram extraídos com o solvente diclorometano. O extrato obtido foi fracionado para a obtenção dos extratos F3-L (contendo a lactona Sch-642305) e F3-SL (sem a presença de Sch-642305) de acordo com GALVÃO et al. (2018). A presença da lactona Sch-642305 foi comprovada através de análises de cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada ao espectrômetro de massas.

## 2.2 Cultivo e tratamento de linhagem C6

A linhagem de GBM de rato (C6) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram semeadas em uma densidade de  $5 \times 10^3$  (96 poços) e  $2 \times 10^4$  (24 poços) para análises de citotoxicidade e sobrevivência clonogênica, respectivamente, e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram tratadas com F3-L e F3-SL em concentrações crescentes de 0,05 a 10 µg/mL ou IC<sub>50</sub> (F3-L: 1 µg/mL; F3-SL: 2,5 µg/mL) durante 48 h. Células não tratadas foram utilizadas como controle.

## 2.3 Análise citotóxica

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina (MTT), o qual quantifica células com metabolismo viável. Já a proliferação foi avaliada pela coloração de proteínas celulares através do reagente Sulforodamina B.

## 2.4 Ensaio clonogênico

Esse método determina a capacidade de formação de colônias celulares. Após 48 h, os tratamentos foram removidos, as células tripsinizadas, semeadas ( $3 \times 10^2$  células/poço) e mantidas em estufa por 10 dias, com trocas periódicas de meio sem o tratamento. O número e o tamanho das colônias foram determinados pelo software Image J.

## 2.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como média±erro padrão e analisados por ANOVA de uma e duas vias seguido dos testes *post-hoc* de Tukey e Bonferroni, respectivamente. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

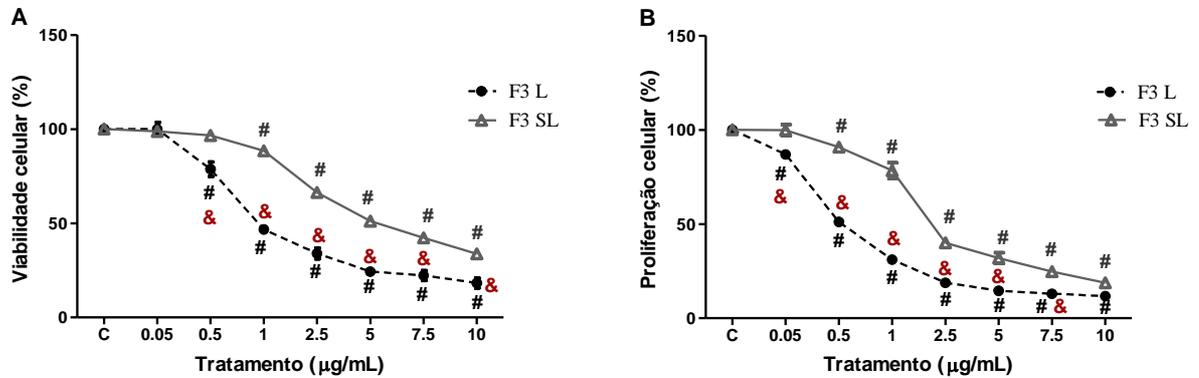
# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado na Figura 1, os extratos fracionados F3-L e F3-SL induziram citotoxicidade de maneira concentração dependente sobre a linhagem C6 de GBM quando comparado às células controle. A fração F3-L (na concentração de 10 µg/mL) foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade e proliferação celular em até 85% e 90%, respectivamente. Enquanto F3-SL promoveu uma redução de cerca de 70% na viabilidade (Figura 1A) e 80% na proliferação (Figura 1B) das células de GBM expostas a 10 µg/mL de extrato. Com base nos resultados apresentados observa-se ainda que F3-L promoveu efeitos citotóxicos significativos quando comparado às células tratadas com F3-SL.

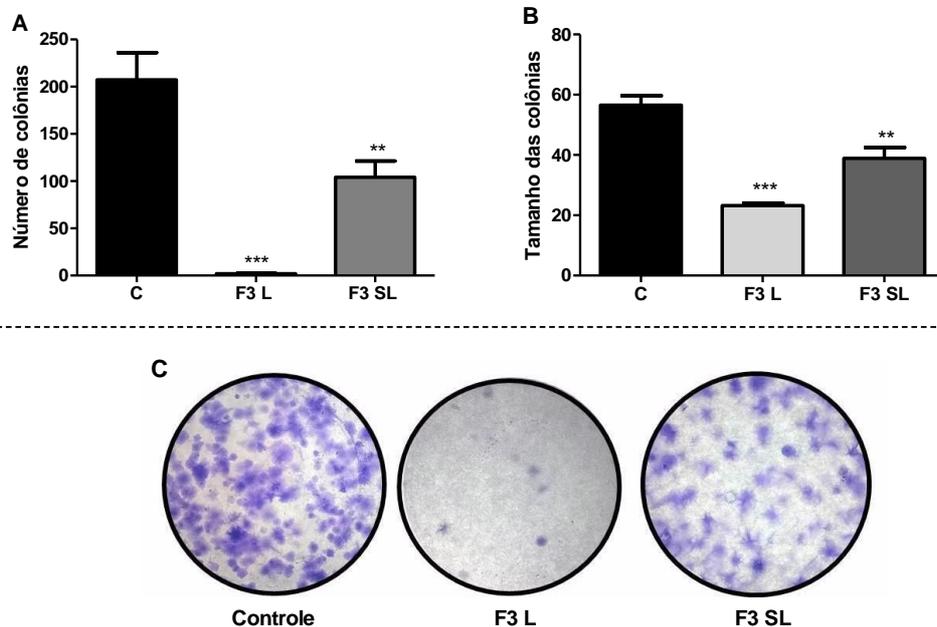
Além disso, as frações F3-L e F3-SL inibiram significativamente a sobrevivência clonogênica da linhagem C6 de GBM, reduzindo a formação de colônias em até 99% e 50% respectivamente, quando comparadas ao controle (Figura 2A). Com relação ao tamanho das colônias de GBM, essa redução foi de 60% para células tratadas com F3-L e 30% para células expostas à fração F3-SL (Figura 2B). Diante do exposto, observa-se que a fração F3-L exibiu efeitos citotóxicos mais proeminentes sugerindo que as propriedades antiglioma exercidas pelo fungo endofítico de *A. saturoioides* seja devido a sua habilidade em produzir a lactona Sch-642305.

Os resultados encontrados corroboram com os descritos por ADELIN et al. (2011), no qual foi reportado que a lactona Sch-642305 isolada do fungo endofítico do gênero *Phomopsis* sp. induziu efeito antitumoral sobre as linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231) e carcinoma colorretal humano

(HCT-116). Ressalta-se que é de extrema importância realizar a busca por novos compostos farmacológicos capazes de inibir o crescimento de células cancerígenas que apresentam um perfil de resistência aos tratamentos disponíveis atualmente.



**Figura 1.** Efeito comparativo de frações F3-L (contendo lactona Sch-642305) e F3-SL (sem a lactona Sch-642305) sobre a viabilidade (A) e proliferação (B) de linhagem de GBM de rato C6 após 48 h de tratamento. Células não tratadas foram utilizadas como controle ('C'). Dados expressos como média±erro padrão, analisados por ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* de Bonferroni. #Significativamente diferente de células controle ( $P<0,0001$ ). &Significativamente diferente de células tratadas com F3-L ( $P<0,0001$ ).



**Figura 2.** Efeito comparativo de frações F3-L (contendo lactona Sch-642305) e F3-SL (sem a lactona Sch-642305) sobre o número (A,C) e tamanho das colônias (B, C) de linhagem de GBM de rato C6 após 48 h de tratamento. Células não tratadas foram utilizadas como controle ('C'). Dados expressos como média±erro padrão, analisados por ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Tukey. \*\*; \*\*\*Significativamente diferente de células controle ( $P<0,001$  e  $P<0,0001$ , respectivamente).

#### 4. CONCLUSÕES

Os compostos provenientes do metabolismo secundário do fungo endofítico isolado de *A. saturoioides* demonstraram um elevado potencial em reduzir a viabilidade, proliferação e sobrevivência clonogênica em células C6. Além disso, o presente estudo demonstrou pela primeira vez a importância da Sch-642305, uma lactona produzida exclusivamente por endofíticos, sobre o efeito antiglioma exercido pelo fungo obtido a partir de *A. saturoioides*. Neste contexto, os metabólitos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos são de grande interesse na farmacoterapia oncológica.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LÉVAIQUE, H.; MARTIN, M.; RETAILLEAU, P.; OUAZZANI, J. Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2406-2412, 2011.

GALVÃO, W.; BRAZ, R.; CANUTO, K.; RIBEIRO, P.; CAMPOS, A.; MOREIRA, A.; GONÇALVES, N. Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* conservationist proposal for the species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 177-189, 2018.

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.

PEDRA, N.; GALDINO, K.; DA SILVA, D.; RAMOS, P.; BONA, N.; SOARES, M.; AZAMBUJA, J.; CANUTO, K.; DE BRITO, E.; RIBEIRO, P.; SOUZA, A. S.; CUNICO, W.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R.; BRAGANHOL, E. Endophytic Fungus Isolated From *Achyrocline saturoioides* Exhibits Selective Antiglioma Activity—The Role of Sch-642305. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 476, 2018.

SOUZA, P.; BIANCHI, S.; FIGUEIRÓ, F.; HEIMFARTHA, L.; MORESCO, K.; GOLÇALVES, R.; HOPPE, J.; KLEIN, C.; SALBEGO, C.; GELAIN, D.; BASSANI, V.; ZANOTTO, A.; MOREIRA, C. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline saturoioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51, p. 23-33, 2018.

STAVROVSKAYA, A. A.; SHUSHANOV, S. S.; RYBALKINA, E. Y. Problems of Glioblastoma Multiforme Drug Resistance. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 2, p. 91-100, 2016.

ZHENG, R.; LI, S.; ZHANG, X.; ZHAO, C. Biological Activities of Some New Secondary Metabolites Isolated from Endophytic Fungi: A Review Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 959, 2021.