

Extrato padronizado de *Cecropia pachystachya* modula parâmetros de estresse oxidativo em plaquetas de ratos submetidos ao modelo pré-clínico de glioblastoma

FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS<sup>1</sup>; NATÁLIA PONTES BONA<sup>2</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>3</sup>; MAYARA SANDRIELLY SOARES DE AGUIAR<sup>4</sup>; FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>5</sup>; CLAITON LEONETI LENCINA<sup>6</sup>

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

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

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

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

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

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – claiton.lencina@ufpel.edu.br

## 1. INTRODUÇÃO

Os gliomas, tumores derivados das células da glia, são os tumores cerebrais mais comuns e letais. Dentre eles o glioblastoma (GB) apresenta maior incidência e agressividade (LOUIS *et al.*, 2021), sendo caracterizado por sua alta capacidade infiltrativa, múltiplas alterações gênicas e danos oxidativos (RAMIREZ *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo (EO) pode ser caracterizado como um desequilíbrio entre o sistema antioxidante do organismo e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ânion superóxido. É bem estabelecido na literatura a influência do EO no desenvolvimento do câncer, dada sua contribuição na ativação de fatores de transcrição que modulam a expressão de genes relacionados a fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, quimiocinas, moléculas reguladoras do ciclo celular e moléculas anti-inflamatórias (REUTER *et al.*, 2010).

Atualmente o tratamento do GB é realizado com cirurgia, quando possível, seguido de radioterapia e quimioterapia, cujo o quimioterápico padrão é a temozolomida (TMZ). Entretanto, a resistência ao TMZ se desenvolve rapidamente (LEE, 2016) e os pacientes apresentam sobrevida média de apenas 15 meses após o diagnóstico (OSTROM *et al.*, 2021). Sendo assim, é urgente a busca por alternativas terapêuticas capazes de melhorar este prognóstico. Neste sentido, destacam-se os compostos naturais isolados e extratos de plantas devido a sua contribuição para a síntese de novos fármacos, ou seu próprio uso na terapêutica (DIAS *et al.*, 2012; NEWMAN & CRAGG, 2020).

O extrato das folhas de *Cecropia pachystachya* (CEC) apresenta relatos na literatura de efeitos farmacológicos relevantes no combate ao câncer, como ação anti-inflamatória e antioxidante (ARAGÃO *et al.*, 2013; GAZAL *et al.*, 2014). Considerando o exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do CEC sobre parâmetros de estresse oxidativo em plaquetas de ratos submetidos ao modelo pré-clínico de glioblastoma.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Preparo do extrato

O CEC 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 de 160 °C; temperatura de saída de 111 °C; fluxo de alimentação de 5%; fluxo de ar de 100%; diâmetro do atomizador de 0,7 mm. Por fim, o extrato bruto seco foi armazenado em freezer a -20 °C.

## 2.2. Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da instituição, sob o número de protocolo CEEA 31292-2018.

## 2.3. Protocolo *in vivo* e quantificação do tamanho do tumor

Para o modelo pré-clínico de GB, os animais foram previamente anestesiados com administração intraperitoneal de cetamina e xilazina. 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 procedimento os animais foram divididos em três grupos: (1) *Sham*, (2) Controle: GB + Veículo, (3) GB + CEC (200 mg/kg/dia). O tratamento foi administrado durante 15 dias pela via intragástrica.

Vinte e um dias após o implante do glioma, os animais foram eutanasiados, o sangue foi coletado por punção venosa central e transferido para tubos contendo anticoagulante, e centrifugado para coleta das plaquetas. 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 (mm<sup>2</sup>) foi quantificada utilizando o software ImageJ. O volume total do tumor (mm<sup>3</sup>) foi calculado multiplicando a seção da fatia e adicionando a área segmentada.

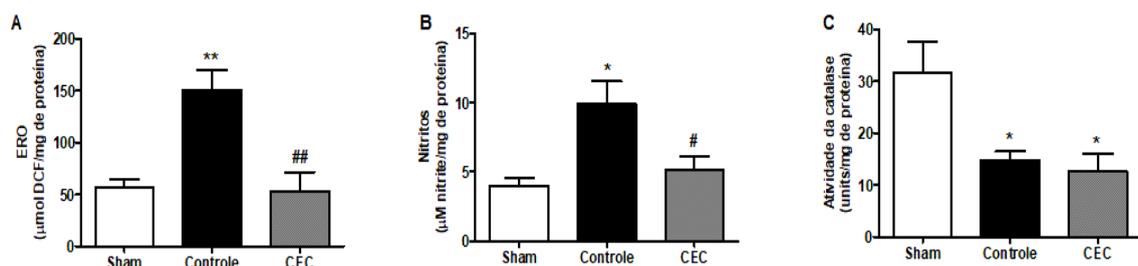
## 2.4. Parâmetros de estresse oxidativo

A produção de ERO intracelular foi avaliada seguindo o método de DOS SANTOS *et al.*, (2017) e os níveis de nitritos conforme reportado por STUEHR & NATHAN (1989). Além disso, foi determinada a atividade da enzima catalase (CAT), de acordo com o método de AEBI (1984).

## 2.5. 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

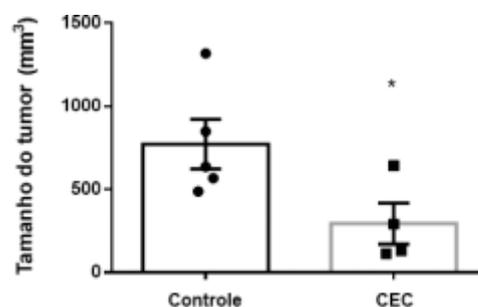


**Figura 1.** Efeito do CEC sobre parâmetros de estresse oxidativo em plaquetas de ratos Wistar em modelo pré-clínico de glioblastoma: (A) produção de ERO; (B) níveis de nitritos; (C) atividade da enzima CAT. Dados expressos como média  $\pm$  erro médio padrão, analisados pela ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey. Dados considerados significativos quando  $P < 0,05$ . \*\* e ##  $P < 0,01$ , quando significativamente diferente do *Sham* e controle, respectivamente.

As plaquetas circulantes possuem papel na coagulação e também no câncer, sendo capazes de afetar o microambiente do GB, fornecendo fatores oncopromotores e pró-angiogênicos (VITO *et al.*, 2016).

As ERO e nitritos apresentam níveis elevados em diversos tipos de câncer. Conforme demonstrado na Figura 1A e 1B, observou-se aumento significativo destas nos animais submetidos ao modelo pré-clínico de GB quando comparado aos animais saudáveis. As ERO estão relacionadas aos efeitos pró-câncer mencionados anteriormente, apresentando um papel significativo na sinalização tumoral, aumentando a proliferação e sobrevivência destas células, além de contribuir para dano celular e instabilidade das células saudáveis (MOLONEY & COTTER, 2018). Ainda, pode-se observar que o tratamento com CEC reduziu 60% dos níveis de ERO e 50% dos níveis de nitritos, equiparando-os aos níveis encontrados nos animais saudáveis.

A CAT faz parte do sistema de defesa do organismo contra ERO, atuando na conversão de peróxido de hidrogênio em água. No GB a atividade da enzima CAT é reduzida, conforme observamos na Figura 1C. Entretanto, em nosso estudo observamos que o tratamento com CEC não foi capaz de restabelecer a atividade desta enzima.



**Figura 2.** Análise do tamanho do tumor. Volume total em  $\text{mm}^3$  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  $P < 0,05$  (\*).

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. Além disso, seu efeito sobre linhagens de GB, bem como seu efeito sobre parâmetros de estresse oxidativo no mesmo, ou em outros tipos de câncer, é pouco explorado.

#### 4. CONCLUSÕES

O tratamento com CEC reduziu significativamente o tamanho do tumor e os níveis de ERO e nitritos em plaquetas de ratos submetidos a um modelo

pré-clínico de GB, apresentando-se como interessante objeto de pesquisa para compor o arsenal terapêutico no combate ao GB.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- 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.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.
- DOS SANTOS, L. M. et al. Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 424, n. 1-2, p. 69-78, 2017.
- 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.
- LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 3, p. 198-210, 2016.
- LOUIS, D. N.; PERRY, A.; WESSELING, P.; BRAT, D. J.; CREE, I. A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; HAWKINS, C.; NG, H. K.; PFISTER, S. M.; REIFENBERGER, G.; SOFFIETTI, R.; VON DEIMLING, A.; ELLISON, D. W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231–125, 2021.
- MOLONEY, J.N.; COTTE, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 50-64, 2018.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal Of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.
- OSTROM, Q. T.; CIOFFI, G.; WAITE, K.; KRUCHKO, C.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. **Neuro-Oncology**, v. 3, n. 3, p. iii1–iii105, 2021.
- RAMIREZ, Y. P.; WEATHERBEE, J. L.; WHEELHOUSE, R. T.; ROSS, A. H. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1475-1506, 2013.
- REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology And Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.
- STUEHR, D.; NATHAN, C. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 169, p. 1543–1555, 1989.
- VITO, C.; NAVONE, S. E.; MARFIA, G.; HADI, L. A.; MANCUSO, M. E.; PECCI, A.; CRISÀ, F.M.; BERNO, V.; RAMPINI, P.; CAMPANELLA, R.; RIBONI, L. Platelets from glioblastoma patients promote angiogenesis of tumor endothelial cells and exhibit increased VEGF content and release. **Platelets**, p. 1369-1635, 2016.