

## POTENCIAL ANTIGLIOMA SELETIVO DO ÁCIDO TÂNICO: EFEITO COMPARATIVO E ASSOCIATIVO COM O TEMOZOLAMIDA

LARISSA MENEZES DA SILVEIRA<sup>1</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>2</sup>; NATÁLIA PONTES BONA<sup>3</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>4</sup>; FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>5</sup>; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [larissamenezes1999@gmail.com](mailto:larissamenezes1999@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nathaliastark@hotmail.com](mailto:nathaliastark@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nataliapbona@gmail.com](mailto:nataliapbona@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rspanevello@gmail.com](mailto:rspanevello@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fmstefanello@gmail.com](mailto:fmstefanello@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mspereirasoares@gmail.com](mailto:mspereirasoares@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GB) é um tumor cerebral agressivo e maligno em virtude de sua elevada atividade mitótica, capacidade de angiogênese e infiltração em tecidos adjacentes, além de apresentar necrose. Dessa forma o GB é classificado pela Organização Mundial de Saúde como um tumor difuso de grau IV (JOHNSON; GIANNINI; KAUFMANN, 2020). A terapia para o tratamento do GB é multimodal e consiste na aplicação da radioterapia em conjunto a utilização do quimioterápico temozolamida (TMZ) (SANTOS et al., 2019). Entretanto, esse tratamento pode tornar-se ineficaz, uma vez que o tumor pode adquirir resistência ao TMZ devido à alteração na expressão de proteínas alquilantes, enzimas de reparo do DNA e nas vias de sinalização celular (LEE, 2016).

Dessa forma, a busca por tratamentos alternativos tem sido extensivamente explorada. Nesse contexto, destacam-se os compostos fenólicos, metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os quais apresentam já descritos um potencial antioxidante, fator protetor frente à incidência de neoplasias (SZAJDEK; BOROWSKA, 2008). Como exemplo desta classe tem-se os taninos, em especial o ácido tânico (AT), que está presente no café, chá verde, uvas, vinho tinto, entre outros (KUO et al., 1992).

SEN et al. (2015) demonstraram o efeito antioxidante do AT sobre o dano oxidativo da isquemia cerebral em roedores. Ademais, já é descrito seu potencial anti-inflamatório em modelo in vivo e antitumoral do AT (ASHAFAQ et al., 2017; ZHANG et al., 2018). Apoiado nos relatos mencionados, o presente estudo teve por objetivo analisar o potencial antitumoral do AT e ainda comparar ao potencial do fármaco TMZ, frente à linhagem de glioma de rato C6.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Cultivo glioma C6

As células de glioma de rato C6 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, EUA). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e então mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 2.2 Cultura primária de astrócitos

Utilizou-se ratos *Wistar* com idade de 1-2 dias, os quais foram submetidos à eutanásia e o córtex cerebral foi isolado, homogeneizado e o *pool* de células centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi

descartado e o *pellet* de células ressuspendido em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (pH 7,6). Os astrócitos foram semeados em uma densidade de  $3 \times 10^4$  células por poço em placas de 96 poços previamente preparadas com poli-L-lisina. As células foram mantidas sob condições padrões, e o meio foi trocado a cada 5 dias até a maturação celular (15-20 dias) (GOTTFRIED et al., 1999). Cabe salientar que este protocolo foi previamente aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal, da UFPEL (CEEA 31292-2018).

### 2.3 Tratamento com ácido tânico - concentrações e tempos de exposição

A solução estoque de AT foi diluída DMEM suplementado com 5% de SFB para obter soluções de 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50 e 75  $\mu\text{M}$ . Após, as células de linhagem C6 foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $5 \times 10^3$  e expostas a AT nas concentrações mencionadas acima por 72 h. Os astrócitos foram expostos ao AT (6.25 a 75  $\mu\text{M}$ ) por 72 h. Após os tratamentos, foram determinadas a viabilidade celular pelo método do MTT e a proliferação celular pelo método do SRB. As células expostas ao DMSO foram consideradas como controle (BONA et al., 2020).

### 2.4 Tratamento com ácido tânico e temozolamida

As células foram semeadas em placas de 6 poços a  $1 \times 10^5$  células/poço e expostas a 75  $\mu\text{M}$  de AT e 75  $\mu\text{M}$  de TMZ por 120 h. Após esse período, foram determinadas a viabilidade celular pelo método do MTT e a proliferação celular pelo método do SRB. Os resultados são expressos como porcentagens do valor de controle (BONA et al., 2020).

### 2.5 Teste de viabilidade celular (MTT)

Após o protocolo experimental nas placas de 96 poços, estas foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e, em seguida, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (0,5 mg/mL). Posteriormente, as células foram incubadas em estufa a 37°C durante 90 minutos. Por fim, o MTT foi removido e o precipitado formado eluído com 50  $\mu\text{L}$  de DMSO. As absorbâncias foram mensuradas em leitor de microplacas em 492 nm.

### 2.6 Teste de proliferação celular (SRB)

O meio de cultura foi removido e em seguida 50  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 50% foi adicionado. Após, a placa foi incubada por 45 minutos a 4°C. Em seguida, o TCA foi retirado e os poços lavados 5 vezes com água destilada. Depois, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de solução sulforrodamina B (SRB) 0,4% em ácido acético e a placa foi novamente incubada por 30 minutos. Em seguida a placa foi novamente lavada 5 vezes com ácido acético 1%. O corante foi solubilizado com 50  $\mu\text{L}$  de Tris (10 mM; pH 10,5). As absorbâncias foram mensuradas em leitor de microplacas em 530 nm.

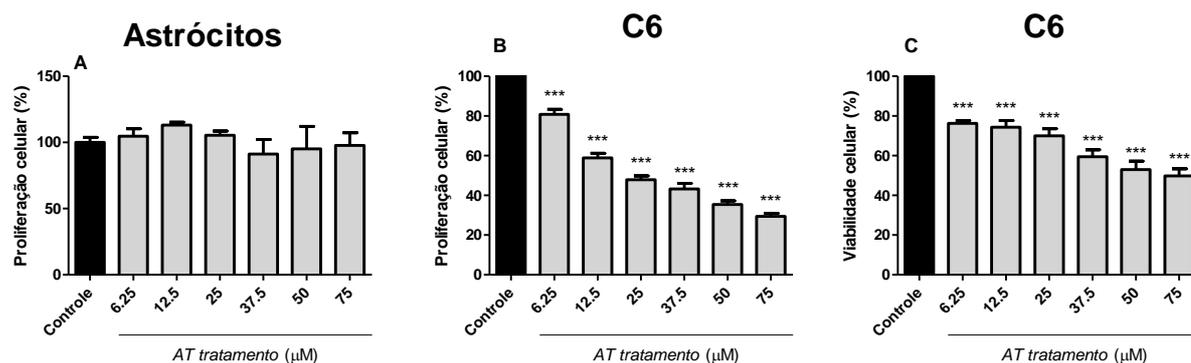
### 2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa quando  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

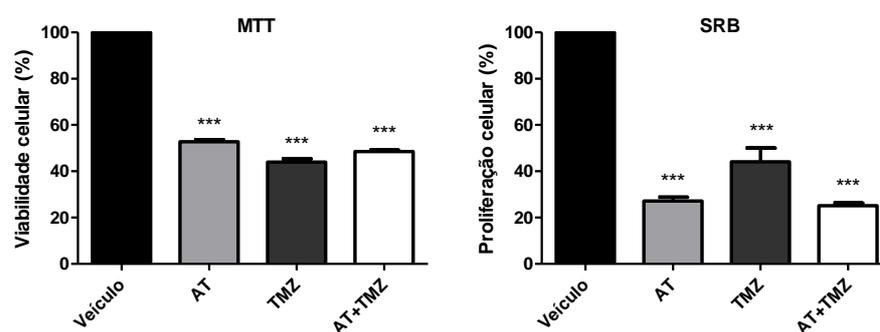
Primeiramente, verificou-se que as culturas celulares de astrócitos expostas ao AT (6.25-75  $\mu$ M), não demonstraram alteração significativa de viabilidade celular após 72 h ( $P>0.05$ ) (**Figura 1A**).

Ademais, é possível observar que houve uma redução da viabilidade (**Figura 1B**) e da proliferação (**Figura 1C**) da linhagem de glioma C6 em todas as concentrações testadas do AT (6.25-75  $\mu$ M) após 72 h de tratamento ( $P<0.001$ ). Cabe salientar, que a redução foi concentração dependente.



**Figura 1.** Efeito do tratamento com ácido tânico (AT) (6.25-75  $\mu$ M) em cultura primária de astrócitos (**A**) e em células de glioma C6 (SRB- **B**; MTT- **C**), após exposição durante 72 h. Dados estão expressos com porcentagem do controle. \*\*\* $p<0,001$  comparado com as células controles.

Ademais, foi realizada a avaliação, em caráter comparativo, da viabilidade e proliferação celular através de ensaio de MTT e SRB após exposição por 120 h: ao AT (75  $\mu$ M), TMZ (75  $\mu$ M) e associação AT e TMZ. Observa-se que todos os testes promoveram redução da viabilidade de forma significativa, quanto à proliferação celular, foi possível observar uma redução mais expressiva pelo AT, sendo esta 17,07% maior que a promovida pelo TMZ (**Figura 2**).



**Figura 2.** Efeito do tratamento com ácido tânico (75  $\mu$ M), temozolamida (75  $\mu$ M) e associação ácido tânico e temozolamida em células de glioma C6, após exposição durante 120 h. Dados estão expressos com porcentagem do controle. \*\*\* $p<0,001$  comparado com as células controles.

A partir dos dados expostos, é possível observar a ação de forma seletiva do AT ao reduzir a viabilidade e também proliferação das células de glioma C6, sem comprometer a proliferação dos astrócitos. Ainda, o AT foi capaz de promover redução significativa da viabilidade celular de forma semelhante ao TMZ, e uma redução superior em relação à proliferação celular. Tal potencial antineoplásico

seletivo é de grande valia, visto que o tratamento convencional acomete também células saudáveis e assim acarreta em efeitos deletérios (LEE, 2016).

#### 4. CONCLUSÕES

Levando em consideração o que foi proposto os resultados obtidos até o ato, demonstram o potencial antineoplásico do AT frente a linhagem de glioma C6 de forma seletiva e ainda uma possível superioridade em relação ao fármaco comumente utilizado. Tais dados suportam estudos futuros para o entendimento dos mecanismos de ação do AT.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHAFAQ, M.; TABASSUM, H.; PARVEZ, S. Modulation of behavioral deficits and neurodegeneration by tannic acid in experimental stroke challenged Wistar rats. **Mol Neurobiol**, v. 54, p. 5941–5951, 2017.
- BONA, N. P. et al. Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, p. 283-239, 2020.
- GOTTFRIED, C. et al. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: Specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). **Brain Research**, v. 833, n. 2, p. 142–149, 3 jul. 1999.
- JOHNSON, D. R.; GIANNINI, C.; KAUFMANN, T. J. Review of WHO 2016 Changes to Classification of Gliomas; Incorporation of Molecular Markers. In: Glioma Imaging. **Springer International Publishing**, p. 127–138, 2020.
- LEE, S. Y. ScienceDirect Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 3, p. 198–210, 2016.
- KUO, M. L.; LEE, K. C.; LIN, J. K. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3- carbinol in the Salmonella and CHO systems. **Mutation Research**, v. 270, p. 87– 95, 1992.
- SANTOS, M. et al. Diretrizes oncológicas 2. São Paulo: **Doctor Press Ed. Científica**, 2019.
- SEN, H. M. et al. Effects of tannic acid on the ischemic brain tissue of rats. **Inflammation**, v. 38, p. 1624–1630, 2015.
- SZAJDEK, A.; BOROWSKA, E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 147–156, 2008.
- ZHANG, J. et al. Tannic acid mediated induction of apoptosis in human glioma Hs 683 cells. **Oncology Letters**, v. 15, p. 6845-6850, 2018.