

ACÇÃO DE FLAVONÓIDES SOBRE A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS DE GLIOMAS

**BERNARDO RIBEIRO BÖHM^{1,2*}, ADINEI ABADIO SOARES^{3*}, DÉBORA
TAVARES DE RESENDE E SILVA⁴.**

1 Introdução

Os gliomas são um tipo de tumor que se origina nas células da glia do sistema nervoso central (SNC). Podendo se apresentar de várias formas e subtipos, desde astrocitomas de baixo grau até glioblastomas multiformes, extremamente malignos, as altas taxas de mortalidade associadas aos gliomas destacam a urgente necessidade de novas abordagens terapêuticas (Björkblom et al., 2022). O câncer, de maneira geral, é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células anormais no corpo a partir de mutações genéticas. No caso dos gliomas, formados pela rápida multiplicação de células erráticas do SNC, há o comprometimento das funções neurológicas do indivíduo, levando a sintomas como convulsões, cefaleias, alterações de comportamento e perda cognitiva (Björkblom et al., 2022).

Nesse sentido, os flavonóides apresentam-se como uma classe de compostos naturais polifenólicos encontrados em uma grande variedade de plantas, conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e potencialmente anticancerígenas. De fácil obtenção, são excelentes candidatos para pesquisas acadêmicas visando ao enfrentamento de neoplasias. A rutina, flavonóide abundante em alimentos como trigo sarraceno, laranjas, maçãs e chá verde, garante efeitos positivos sobre a circulação sanguínea e na proteção contra enfermidades cardiovasculares. Além disso, exerce um papel significativo na redução do estresse oxidativo e da inflamação, críticos na progressão de diversas doenças, incluindo os

1 Titulação acadêmica: Acadêmico de medicina, instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Chapecó-SC, contato: berbohm@gmail.com.

2 Grupo de pesquisa: Grupo de Estudo e Pesquisa Interdisciplinar Saúde e Cuidado (GEPISC).

3 Titulação acadêmica: Acadêmico de medicina, instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Chapecó-SC, contato: adinei.soares@estudante.uffs.edu.br.

4 Titulação acadêmica: Doutora em Ciências da Saúde, instituição: Professora na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), **Orientador(a)**.

gliomas (Ponte et al., 2021).

Em relação aos tumores primários do SNC, sabe-se que a rotina pode induzir a sua apoptose a partir da inibição de cascatas inflamatórias. Dessa forma, os flavonóides, quando em concentrações adequadas, podem se apresentar como uma ferramenta eficaz na eliminação do câncer, oferecendo uma nova esperança para o seu tratamento. Isto é, em se tratando da ação dos flavonóides sobre o câncer, Kusaczuk e colaboradores (2022) apontam que a sua presença no microambiente tumoral é capaz de reduzir os níveis de adenosina trifosfato (ATP) lançados ao exterior celular, atenuando a ativação dos receptores do sistema purinérgico corporal localizados no interstício, responsáveis por desencadear parte dos mediadores inflamatória até a neoplasia. A inflamação em excesso promovida pelo glioma é um fator fundamental para garantir a sua nutrição local até a angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos pelo tumor, seguida da sua invasão e metástase. Dessa forma, os polifenóis possibilitam o controle sobre a multiplicação tumoral e se apresentam como potenciais agentes terapêuticos (Ponte et al., 2021).

2 Objetivos

Objetivos gerais: Avaliar in vitro a atividade e expressão dos componentes do sistema purinérgico e de parâmetros inflamatórios de células de gliomas expostas a flavonóides em diferentes concentrações (1 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M).

Objetivos específicos: Caracterizar as células quanto à expressão de proteínas do citoesqueleto e morfologia; Avaliar o potencial de indução à apoptose; Investigar o efeito citotóxico; Avaliar a viabilidade e migração celular, assim como formação de colônias; Analisar a atividade e expressão das ectoenzimas como E-NTPDase, Ecto-5'-Nucleotidase e ADA; Avaliar a expressão gênica e proteica dos receptores purinérgicos e adenosinérgicos P2X7, P2Y6, P2Y12, P2Y2, A2A e A3; Analisar o perfil inflamatório a partir das citocinas TH1/TH2; Realizar análise imunocitoquímica da expressão de marcadores de autofagia e apoptose; Correlacionar dose e tempo de diluição à viabilidade e morte celular, formação de colônias, apoptose e alteração no ciclo celular.

3 Metodologia

Tipo de estudo: Pesquisa quantitativa, transversal, do tipo caso-controle, com linhagens celulares de gliomas e linhagens celulares de controles não tumorais, cultivadas em frascos com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e antifúngico anfotericina B, e mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. A - Avaliação do perfil inflamatório e purinérgico por intermédio de de kit comercial, PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), western-blot, citometria de fluxo e protocolos de pesquisa.

4 Resultados e Discussão

Desde o início do projeto foram iniciados os preparativos do ambiente laboratorial e a obtenção de material para realizar o tratamento das células de gliomas e células saudáveis no laboratório da UFFS no campus de Chapecó no estado de Santa Catarina. Nesse contexto, a primeira exposição das células de glioma e células não tumorais aconteceu no mês de fevereiro do ano de 2024.

Igualmente, as tentativas de cultivo para a multiplicação das células e a exposição delas ao flavonóide rutina continuaram até o mês da elaboração deste resumo (julho do ano de 2024). Todavia, ressalta-se que as células de gliomas foram contaminadas por fungos enquanto mantidas em estufa de CO₂, a partir de um mau funcionamento que impossibilitou a manutenção do ambiente estéril, apesar de utilizados protocolos replicáveis para preparo dos materiais, como em Yan et al. (2019), de forma que esses invasores acabaram por inviabilizar o uso de todas as células estimadas na pesquisa. A infecção fúngica acabou por comprometer a credibilidade científica dos resultados obtidos em experimentos anteriores e invalidou a sua publicação, pois promoveu a substituição das células de gliomas por células de fungos, como evidenciado por meio de ensaios de viabilidade celular com MTT, os quais apresentaram dados discrepantes dos esperados. Por falta de verba institucional, até o momento da publicação deste resumo não houve manutenção da incubadora de CO₂ presente no laboratório de cultivo celular.

Em contrapartida, os responsáveis por essa pesquisa puderam se dedicar também na escrita de um capítulo de livro sobre a mesma temática intitulado “Tratamento com Rutina em cultivo celular de Gliomas” (Soares et al., 2024), o qual foi publicado no livro “Jornada

Médica: Desafios e Triunfos na Prática da Medicina 6” (Silva Neto, 2024), pela Editora Atenas, em 17 de maio de 2024. Neste trabalho foi observado que os gliomas malignos pertencem a subgrupos de neoplasias agressivas e invasivas do sistema nervoso central, de forma que as terapias neurocirúrgicas atuais nem sempre garantem a cura ao paciente. Nesse viés, a rutina se apresenta como uma alternativa promissora na terapia adjuvante contra essa doença, pois pode promover ativação das vias de apoptose de células doentes, induzir a parada da divisão celular nos tumores e orquestrar o metabolismo celular para evitar o desenvolvimento do câncer (Soares et al., 2024).

A rutina possui a capacidade de supressão das vias de inflamação crônica presentes no desenvolvimento dos gliomas. Assim, reduz níveis corporais de TNF (Fator de Necrose Tumoral), STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) e IL-6 (Interleucina-6 (Soares et al., 2024), controlando e evitando o crescimento dos gliomas por meio de ação sobre o processo inflamatório. Igualmente, a rutina pode ativar as vias de ativação da expressão do gene supressor de tumores P53, promover a emissão do citocromo C no processo de apoptose de células doentes, estimular BAX (Bcl-2-associated X protein), regular a expressão do gene BCL, e estimular a caspase-3 e caspase-9 para o controle de tumores (Soares et al., 2024). Além disso, regula negativamente a inflamação pela inibição das vias inflamatórias associadas a IL-6, Interleucina 1 beta, fator nuclear kappa B (NF- κ B), STAT3 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), evitando o desenvolvimento de glioglastomas pelo controle das vias metabólicas celulares (Lima et al., 2024). Ademais, possui a capacidade de indução da apoptose em células cancerígenas por meio de estímulos sobre as produções de caspase-3, caspase-8 e caspase-9. O processo apoptótico induzido decorre da atuação da proteína Bcl-2-associated X, promovida pelo flavonóide rutina (Guon & Chung, 2016).

5 Conclusão

Os estudos e o capítulo do livro “Tratamento com Rutina em cultivo celular de Gliomas” escrito pelos pesquisadores deste trabalho concluem que publicações científicas disponíveis em bancos de dados, tais como o conceituado Pubmed, demonstram que as células de gliomas expostas à rutina, seja no ambiente *in vitro* ou *in vivo*, são reduzidas ou mesmo mortas pela rutina, a depender da concentração de flavonóide utilizada. Isso ocorre devido a regulação negativa das vias pró-tumorais pela rutina, bem como a inflamação crônica

induzida pelos níveis elevados de TNF, STAT3 e IL-6. Além disso, a rutina é capaz de induzir a apoptose de células doentes pela ativação de caspases, como a caspase-3 e caspase-9. Portanto, o composto natural flavonóide demonstra grande potencial para o desenvolvimento de terapia adjuvante no combate aos gliomas humanos.

Referências Bibliográficas

BJÖRKBLÖM, B.; WIBOM, C.; ERIKSSON, M. et al. Distinct metabolic hallmarks of WHO classified adult glioma subtypes. *Neuro Oncol.*, v. 24, n. 9, p. 1454-1468, 2022.

GUON, T. E.; CHUNG, H. S. Hyperoside and rutin of *Nelumbo nucifera* induce mitochondrial apoptosis through a caspase-dependent mechanism in HT-29 human colon cancer cells. *Oncol Lett.*, v. 11, n. 4, p. 2463-2470, abr. 2016. doi:10.3892/ol.2016.4247.

KUSACZUK, M.; KRĘTOWSKI, R.; NAUMOWICZ, M.; STYPUŁKOWSKA, A.; CECHOWSKA-PASKO, M. A Preliminary Study of the Effect of Quercetin on Cytotoxicity, Apoptosis, and Stress Responses in Glioblastoma Cell Lines. *Int J Mol Sci.*, v. 23, n. 3, p. 1345, 2022. doi:10.3390/ijms23031345.

LIMA, I. S.; SOARES, É. N.; NONAKA, C. K. V.; SOUZA, B. S. F.; DOS SANTOS, B. L.; COSTA, S. L. Flavonoid Rutin Presented Anti-Glioblastoma Activity Related to the Modulation of Onco miRNA-125b Expression and STAT3 Signaling and Impact on Microglia Inflammatory Profile. *Brain Sci.*, v. 14, n. 1, p. 90, 2024. doi:10.3390/brainsci14010090.

PONTE, L. G. S.; PAVAN, I. C. B.; MANCINI, M. C. S. et al. The Hallmarks of Flavonoids in Cancer. *Molecules*, v. 26, n. 7, p. 2029, 2021. doi:10.3390/molecules26072029.

SILVA NETO, Benedito R. da (Org.). *Jornada médica: desafios e triunfos na prática da medicina*. 6. ed. 2017. 221 p. ISBN 978-65-258-2403-1. Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.031241705>. Acesso em: 29 jul. 2024.

SOARES, A. A.; BOHM, B. R.; MEYER, A.; CUNHA, M. L. V.; LUCENA, L.; SOUZA, J. V. G.; BARBOSA, L. L.; SILVA, D. T. R. Tratamento com Rutina em cultivo celular de Gliomas. In: *Jornada Médica: Desafios e Triunfos na Prática da Medicina 6*. Editora Atenas, 2024. Capítulo 22, p. 154-163. doi:<https://doi.org/10.22533/at.ed.03124170522>.

YAN, X.; HAO, Y.; CHEN, S. et al. Rutin induces apoptosis via P53 up-regulation in human glioma CHME cells. *Transl Cancer Res.*, v. 8, n. 5, p. 2005-2013, 2019.

Palavras-chave: Flavonóides, Neoplasia, Rutina, Sistema Nervoso Central

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2023-0434.

Financiamento: EDITAL Nº 73/GR/UFFS/2023: GRUPO 1 (Bolsas IC) - UFFS.