UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLOGICO

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da atividade citotóxica da Ayahuasca e suas β-carbolinas, Harmina e Harmalina, em Glioblastoma Multiforme (C6)

Fernanda Gelati Sekine

Pelotas, 2018

Fernanda Gelati Sekine

Avaliação da atividade citotóxica da Ayahuasca e suas β-carbolinas, Harmina e Harmalina, em Glioblastoma Multiforme (C6)

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Profª Giana de Paula Cognato, Dra.

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S111 Sekine, Fernanda Gelati

Avaliação da atividade citotóxica da Ayahuasca e suas β-carbolinas, harmina e harmalina, em glioblastoma multiforme (C6) / Fernanda Gelati Sekine ; Giana de Paula Cognato, orientadora. — Pelotas, 2018.

33 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Glioma. 2. Ayahuasca. 3. Câncer. 4. β-carbonilas. I. Cognato, Giana de Paula, orient. II. Título.

CDD : 614.5999

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Banca avaliadora:

Profª Giana de Paula Cognato, Dra (orientadora), UFPEL

Profª Izabel Cristina Custódio de Souza, Dra, UFPEL

Mayara Sandrielly Pereira Soares, Msc, UFPEL

Natália Pontes Bona, Bel, UFPEL

Dedico esse trabalho aos meu pais, Roberto e Gabriela, por terem me ensinado a nunca desistir, mesmo quando tudo parece estar perdido.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus pais, por todo apoio dado ao longo desses anos de faculdade, sem isso nada teria sido possível, agradeço a minha irmã pela amizade sincera, que só irmãos conseguem nos dar.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo dessa jornada, aqueles que me acolheram e fizeram eu me sentir em casa, mesmo tão longe de casa. Que me ajudaram nas horas mais difíceis e que comemoraram comigo nas mais alegres, em especial a Ângela, Jade, Mirna e Raíssa por serem as bruxas boas da minha vida. Aos meninos, Gabriel, Junior e Guilherme, pelas ótimas aventuras e conversas.

Quero agradecer aos amigos que fiz dentro da Biotec, companheiros de aulas, trabalhos e estagio, em especial ao Aury, Carolina e Caroline, a Liliane e o Lorenço.

Quero agradecer a minha orientadora por ter me aceitado como sua aluna, e ter depositado tanta confiança em mim.

Agradeço os colegas do Neurocan, pelo companheirismo e apoio, em especial a Nathalia Pedra pelo auxilio e orientação e a Natália Bona, pelo carinho.

Agradeço também as professoras Roselia e Francieli por todas as palavras de incentivo.

Agradeço aos meus professores na Biotec, por terem me passado seus conhecimentos da melhor maneira possível. E os funcionários que estavam sempre ali para auxiliar os alunos, em especial a Renata.

Por fim agradeço a Universidade Federal de Pelotas através do Centro de Desenvolvimento Tecnológico e ao Núcleo de Biotecnologia, pelo empenho na minha formação.

A FAPERGS pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que esse momento fosse possível.

Obrigada!

Resumo

SEKINE, Fernanda Gelati. **Avaliação da atividade citotóxica da Ayahuasca e suas β-carbolinas, Harmina e Harmalina, em Glioblastoma Multiforme (C6).** 2018. 33f Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

O Glioblastoma Multiforme (GBM), um glioma de grau IV, é o tumor cerebral mais agressivo. Seu tratamento consiste em intervenção cirúrgica seguido de sessões de radioterapia e quimioterapia com Temozolomida (TMZ). Entretanto, pacientes acometidos pelo GBM exibem sobrevida de 14 meses, mesmo em tratamento. Por essa razão a busca por novos métodos para a melhora do prognóstico do GBM é essencial. A Ayahuasca (AYA) é obtida a partir da cocção do cipó *Banisteriopsis caapi* e as folhas do arbusto *Psycotria viridis*. Essas plantas possuem alcaloides DMT (N,N-dimetiltriptamina) e também β-carbolinas como a harmina (HRM) e harmalina (HRL), as quais exibem diversos efeitos farmacológicos. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi testar a citotoxidade da AYA e suas β-carbolinasem linhagem de células tumorais de glioma de rato C6 e em linhagem primaria de astrócito. As células foram expostas à AYA, HRM e HRL por 24, 48 e/ou 72 h em concentrações variando entre 2,5– e/ou 100 µg/mL. Após, a viabilidade das células foi avaliada por teste de MTT e os valores de absorbância foram determinados a 492nm. Os resultados obtidos revelaram importante atividade citotóxica da AYA e suas β-carbolinas HRM e HRL, as quais foram capazes de reduzir de maneira significativa a viabilidade celular da linhagem de glioma C6 principalmente nas concentrações a partir de 100 µg/mL especialmente após 72 h de tratamento reduzindo a viabilidade celular em 72%, 59% e 68% após 24 h, respectivamente. Contudo não houve redução significativa da viabilidade celular para os astrócitos, demonstrando a capacidade desses compostos de uma citotoxidade seletiva para tumor. Esses resultados corroboram com vários estudos que mostram um potencial anti-tumoral de β-carbolinas e elucidam o potencial da AYA. Neste sentido, conclui-se que tanto a AYA como as β-carbolinas possuem elevado potencial citotóxico, de maneira concentração dependente, representando uma ferramenta promissora no tratamento do GBM.

Palavra-chave: Glioma; Ayahuasca; β-carbolinas; câncer

Abstract

SEKINE, Fernanda Gelati. "**Evaluation of the citotoxic activity of Ayahuasca e its β-carbolines, Harmine and Harmaline, in Glioblastoma Multiforme (C6)".** 2018. 35f Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

The Glioblastoma Multiforme (GBM), a grade IV glioma, is the most aggressive brain tumor. Its treatment consists of surgical intervention followed by radiotherapy and chemotherapy sessions, using the chemotherapy Temozolomide (TMZ). However, patients undergoing GBM treatment exhibit 14-month survival. For this reason the search for new methods to improve the GBM prognosis is essential. Ayahuasca (AYA) is obtained from the cooking of the *Banisteriopsis caapi* liana and the leaves of the shrub *Psycotria viridis*,. These plants have DMT (N, N-dimethyltryptamine) alkaloids and also β-carbolines such as harmine (HRM) and harmaline (HRL), which exhibit various pharmacological effects. The aim of this study was to test the cytotoxicity of AYA and its β-carbolines in lineage of C6 rat glioma tumor cells and in primary astrocyte lineage. Cells were exposed to AYA, HRM and HRL for 24, 48 and / or 72 h at concentrations ranging from 2.5- and / or 100 µg / ml. After, cell viability was assessed by MTT test and absorbance values were determined at 492nm. The results showed a significant cytotoxic activity of AYA and its β-carbolines HRM and HRL, which were able to significantly reduce the cell viability of the C6 glioma line, especially at concentrations of 100 µg / mL, especially after 72 h treatment reducing cell viability in 72%, 59% and 68% after 24 h, respectively. However, there was no significant reduction in cell viability for astrocytes, demonstrating the ability of these compounds to selectively target tumor cytotoxicity. These results corroborate with several studies that show an anti-tumor potential of β-carbolines and elucidate the potential of AYA. In this sense, it is concluded that both AYA and β-carbolines have a high cytotoxic potential, in a concentration-dependent manner, representing a promising instrument in GBM treatment.

Key words: Glioma; Ayahuasca; β-carbolines; cancer

Lista de figuras

Figura 1 - Avaliação da viabilidade celular de linhagem de glioma de rato C6 sobre tratamento com Ayahuasca. 26

Figura 2 - Avaliação da viabilidade celular de linhagem de glioma de rato C6 sobre tratamento com Harmina..... 27

Figura 3 - Avaliação da viabilidade celular de linhagem de glioma de rato C6 sobre tratamento com Harmalina..... 28

Figura 4 - Avaliação da viabilidade celular em Astrócitos de cultivo primário após tratamento com Ayahuasca, Harmina e Harmalina..... 29

Lista de abreviatura, siglas e símbolos

% - Porcentagem

< - Menor

µg – Micrograma

ATCC – American Type Culture Collection

AYA – Ayahuasca

C33A – Linhagem Carcinoma Cervical humano

C6 – Linhagem de Glioma de Rato

CCD18Lu – Linhagem de Fibroblasto

CEA – (do inglês) Antígeno Carcino embrionário

CEEA – Comitê de Ética e Experimentação Animal

CONAD – Conselho Nacional Antidrogas

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMT – N,N-dimetiltriptamina

GBM – Glioblastoma Multiforme

HeLa – linhagem de Carcinoma cervical Humano

HepG2 – Linhagem de Carcinoma Hepatocelular Humano

HL60 – Linhagem de Leucemia Humana

HRL – Harmalina

HRM – Harmina

IDH 1 – Isocitrato Desidrogenase 1

IDH 2 – Isocitrato Desidrogenase 2

MAO – Monoamina Oxidase

mL – Mililitro

ºC – Graus Celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

PSA – (do inglês) Antígeno Específico da Próstata

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

TMZ – Temozolamida

β – Beta

Sumário

1 Introdução 12
2 Objetivo 14
2.1 Objetivos gerais 14
2.2 Objetivos específicos 14
3. Revisão bibliográfica 15
3.1 Glioma 15
3.1.2 Classificação dos Gliomas 15
3.2 Glioblastoma multiforme 16
3.3 Tratamento 17
3.4 Ayahuasca 18
3.5 Alcaloides β-carbolinas 19
4. Materiais e métodos 20
4.1 Ayahuasca e β-carbolinas 20
4.2 Cultivo de linhagem celular 20
4.3 Cultivo primário de astrócitos 20
4.4 Exposição da linhagem de glioma e cultivo primário de astrócitos à AYA e β-carbonilas 21
4.5 Teste de Viabilidade por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium)] 21
4.5 Análise estatística 22
5. Resultados e discussão 23
6. Conclusão 29
7. Referencias 30

1. Introdução

Os gliomas são tumores provenientes das células da glia responsáveis por 30% dos tumores cerebrais, entre os quais 80% são malignos (GOODENBERGER; JENKINS, 2012). A Organização Mundial da Saúde classifica os gliomas em 4 graus de acordo com a sua malignidade, sendo o glioblastoma multiforme (GBM) o tumor mais agressivo que atinge principalmente adultos. O GBM é responsável por aproximadamente 15% dos tumores primários do sistema nervoso central e 55% de todos os gliomas (GOODENBERGER; JENKINS, 2012). Apesar de o tratamento consistir em remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida do paciente acometido pelo GBM é de, em média, 14 meses (MEIR et al., 2010). Por essa razão a busca por novos tratamentos para a melhora do prognóstico dos pacientes acometidos por esta neoplasia maligna é muito importante.

Desde os tempos antigos, busca-se nos produtos naturais, alternativas para combater doenças severas como o câncer (EFFERTH et al., 2007; ZAID et al., 2010). No Brasil, na região da bacia Amazônica, várias tribos aborígenes possuíam uma bebida utilizada em rituais xamânicos e curativos conhecida como Ayahuasca (AYA), a qual tem sua utilização bem estabelecida, antes mesmo da colonização, cujos relatos de seu uso datam desde 2000 a.C. (MCKENNA; CALLAWAY; GROB, 1998).

A Ayahuasca consiste em uma bebida psicoativa, preparada para rituais xamânicos dos índios da região do Amazonas, e é feita a partir da cocção do cipó *Banisteriopsis caapi* e as folhas do arbusto *Psycotria viridis* (SCHENBERG, 2013). Essa bebida possui alcaloides com atuação na via serotoninérgica como o DMT (N,N-dimetiltriptamina) e também β-carbolinas como a harmina (HRM) e harmalina (HRL) que tem propriedades inibidoras da Monoamina oxidase (MAO) (SCHENBERG, 2013). Segundo Gabilondo e colaboradores (2008), a MAO é uma enzima com atividade aumentada em GBM. Além disso, estudos apontam interessantes efeitos citotóxicos das β-carbonilas sobre linhagens de leucemia humana (HL60), carcinoma cervical (C33A) e carcinoma hepato celular humano (HepG2) (ZAKER; OODY; ARIMAND, 2007; JIMÉNEZ et al., 2008; CAO et al., 2011).

Levando em consideração a falta de um tratamento eficiente que leva a cura para o GBM, a busca por novas modalidades terapêuticas que tenha um melhor prognostico dessa doença, é de extrema relevância.

2. Objetivo

2.1 Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho foi avaliar a citotoxidade da AYA e suas β-carbolinas, HRM e HRL, em linhagem C6 de glioma de rato e células de cultivo primário de astrócito.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico do chá de AYA e β-carbolinas HRM, HRL em células tumorais de glioma de rato C6, através do teste de viabilidade celular

- Avaliar os efeitos citotóxicos do chá de AYA e β-carbolinas HRM e HRL em cultivo primário de astrócitos

3. Revisão bibliográfica

3.1 Glioma

Tumor maligno também comumente conhecido como câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que tem como característica principal o crescimento desordenado de suas células, que muitas vezes possuem a habilidade de invadir outros tecidos e órgão (INCA, 2018). Já os tumores benignos não possuem capacidade invasiva, crescem em uma conformação mais organizada formando uma massa no tecido, sendo então possível fazer a remoção cirúrgica dessa massa tumoral na maioria dos casos (ALBERTS et al., 2010).

Os gliomas são os tumores cerebrais primários mais comuns, sendo responsáveis por 81% dos tumores malignos acometidos no Sistema Nervoso Central (SNC) (OSTROM et al., 2014). Possuindo uma grande variabilidade histológica e graus de malignidade, sendo a classificação histológica baseada em semelhanças morfológicas com células da glia não tumorais (RIEMENSCHNEIDER et al., 2010).

3.1.2. Classificação dos Gliomas

A partir de 2007, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou um protocolo de identificação e classificação de gliomas, que foi centrado na identificação de três fatores: o tipo celular, a localização e o grau de malignidade do tumor (Louis et al., 2007). Porém, em 2016, os parâmetros de identificação dos tumores do SNC foram atualizados, sendo excluídos variantes e padrões que já não são mais de suma importância para o diagnóstico. Nesta atualização também foram incluídas neoplasias recém descobertas e parâmetros moleculares, elevando o diagnóstico desses tumores a níveis moleculares (LOUIS et al., 2016).

De acordo com a OMS, em sua primeira classificação (2007), os gliomas classificados segundo sua histologia eram agrupados de maneira que todos os gliomas astrocíticos pertenciam ao mesmo grupo. Contudo, na nova classificação, os gliomas difusamente infiltrantes são agrupados juntos, podendo eles ser tanto astrocitários quanto oligodendrogliais, baseando-se não

apenas em seu padrão de crescimento, mas também nas características genéticas compartilhadas nos genes Isocitrato Desidrogenase 1 e Isocitrato Desidrogenase 2 (IDH1 e IDH2) (LOUIS et al., 2016).

Sobre o grau de malignidade do tumor, a OMS classificou 4 diferentes graus (LOUIS et al., 2007). Os tumores classificados como grau I são aqueles considerados histologicamente benignos e que podem ser curados por meio de intervenção cirúrgica, sendo esse grau mais comum em crianças. Os tumores que mais comumente acometem em adultos são os tumores infiltrativos que normalmente se apresentam no grau II a IV (FANG et al., 2012). Destes, os tumores de grau II apresentam leve proliferação celular, e possuem pleomorfismo celular moderado tornando a intervenção cirúrgica mais difícil devido a capacidade de infiltração no cérebro circundante. Já os tumores de grau III tem uma alta proliferação e apresenta hipercelularidade e são malignos, levando a sobrevida do paciente a uma média de 2 a 5 anos. Por fim, os tumores de grau IV são extremamente agressivos e malignos, possuindo um aumento de atividade mitótica, e uma alta capacidade de angiogênese, também apresentando necrose e sendo resistentes à quimioterapia. O GBM faz parte desse último grupo (FANG et al., 2012).

3.2 Glioblastoma multiforme

Os GBM são tumores cerebrais altamente agressivos, possuindo uma taxa elevada de mortalidade com uma sobrevida curta, por volta de 14 meses após o diagnostico inicial (MEIR et al., 2010). Esses tumores constituem mais de 50% das neoplasias do SNC, possuindo uma grande heterogeneidade histológica e clínica (HOLLAND, 2001).

Classificado como um astrocitoma de grau IV, por ser originário de astrócitos e por sua tamanha agressividade, o GBM não possui capacidade metastática, como a maioria dos tumores malignos (MEIR et al., 2010). Por sua vez esse tumor possui células heterogêneas geneticamente instáveis, apresentando alta capacidade infiltrativa pelo tecido cerebral e de angiogênese, e também alta resistência quimioterápica (WEN et al. 2008).

Considerando características histopatológicas e apresentação clínica, o GBM é subdividido em duas categorias, o GBM primário que se manifesta clinicamente como um tumor de grau IV, e o GBM secundário que é o tumor que evolui a partir de tumores de graus menores, levando em torno de 5 a 10 anos até atingir o maior grau de malignidade (MAHER et al., 2006).

3.3 Tratamento

Inicialmente, a abordagem terapêutica comumente utilizada é a cirurgia de desbridamento de tumor e obtenção de tecido para diagnóstico. Quando não é possível a ressecção total do tumor devido a condições não favoráveis, tais como o posicionamento do tumor onde sua retirada possa levar a um comprometimento de funções neurológicas, uma biópsia deve ser realizada (STUPP et al., 2010). Posteriormente à cirurgia, é recomendado um tratamento de seis semanas de radioterapia com terapia sistêmica juntamente com a temozolamida (TMZ) que é utilizada durante pelo menos seis meses (MRUGALA et al.,2013).

Mesmo com as terapias existentes no momento, a média de sobrevida do paciente acometido pelo GBM é de apenas 12-14 meses após o diagnóstico (STUPP et al., 2005). Comparando os tratamentos de radioterapia isolados, com a combinação com o quimioterápico TMZ, há um aumento da média da sobrevida de 12,1 meses para 14,6 meses (STUPP et al., 2005). Contudo o prognóstico continua ruim, pois as células neoplásticas invadem o parênquima cerebral dificultado a remoção completa do tumor, que naturalmente é resistente a maioria dos fármacos citotóxicos e a radioterapia (LEFRANC et al., 2005).

Apesar de o TMZ ser um pro-fármaco administrado via oral, que tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e que geralmente é associada a uma baixa toxicidade (NEWLANDS et al., 1997), ainda assim não é um fármaco ideal, tendo em vista as vias de reparo de DNA que promovem o desenvolvimento de resistência ao TMZ (YOSHIMOTO et al., 2012). Este processo desencadeia um impacto negativo para a sobrevida dos pacientes já que na atualidade não se tem um tratamento eficiente contra o tumor

recidiva/resistente, sendo esse um problema clinico significativo (OLIVA et al., 2010). Neste contexto, a busca por novas abordagens terapêuticas torna-se importante a fim de reduzir o desenvolvimento do tumor, melhorando assim, o prognóstico dos pacientes acometidos pelo GBM.

3.4 Ayahuasca

A AYA é uma bebida psicotrópica preparada através da cocção de diversas plantas nativas da floresta amazônica e utilizada pelos índios dessa região em rituais xamânicos (MCKENNA; TOWERS; ABBOT, 1984). Muito comumente essa bebida é preparada a partir de apenas duas plantas principais: o cipó *Banisteriopsis caapi* e as folhas do arbusto *Psycotria viridis.* Ambas as espécies ocorrem naturalmente em toda a floresta amazônica (Brasil, Colômbia, Bolívia, Peru e Equador) (PIRES; OLIVEIRA; YONAMINE, 2010).

O cipó *B. caapi* possui compostos alcaloides inibidores da MAO, tais como as β-carbolinas harmalina e harmina, enquanto as folhas do arbusto *P. viridis* possuem em sua composição o alcaloide derivado indólico N,N-dimetiltriptamina (DMT) (MCKENNA; TOWERS; ABBOT, 1984), cuja estrutura química está relacionada ao neurotransmissor serotonina (OLIVEIRA et al., 2012). Os alcaloides harmala não são particularmente psicoativos por conta própria, eles podem auxiliar a chegada do DMT ao cérebro através da inibição da MAO no fígado e facilitar sua atividade inibindo a MAO no SNC (OTT, 1994; MCKENNA; TOWERS; ABBOT,1984).

Em meados dos anos 1980, a AYA passou a se popularizar em outras regiões do Brasil e outros lugares do mundo, com o propósito religioso e espiritual, tendo uma concentração em centros urbanos (MCKENNA, 2004). Em 2004, o Conselho Nacional Antidrogas (CONAD) aprovou o uso da AYA em contexto ritualístico e religioso, a partir daí vários estudos tem avaliado o efeito do consumo da AYA em pacientes com transtorno de humor, como depressão.

Em 2013, Schenberg (2013), publicou uma revisão bibliográfica em relação ao conhecimento biomédico da AYA com enfoque principalmente na relação dessa bebida com o tratamento do câncer. Nessa revisão os autores

descrevem nove relatos de casos de pessoas que declaram ter encontrado na AYA algum tipo de benefício ou cura na utilização da cocção como tratamento alternativo. Os relatos são de pessoas com variados tipos de tumor, como de mama, estômago, útero, próstata, colón, ovário e cérebro. Dentre os nove, têm-se três pacientes em que foi detectada uma melhora em exames clínicos, como nível de PSA (Prostate-Specific Antigen) ou CEA (Carcino Embryonic Antigen). Neste estudo, houve uma piora significativa somente em um dos casos (SCHENBERG, 2013).

3.5 Alcaloides β-carbolinas

As β-carbolinas harmina e harmalina presentes na Ayahuasca foram identificadas pela primeira vez na planta *Peganum harmala*, uma planta originaria da Ásia e Oriente Médio. Entretanto, esses alcaloides também foram encontrados em concentrações consideráveis na *B. caapi,* planta nativa da floresta amazônica, que variam dentre 0,05% a 1,95% do peso seco. Na *P. viridis* as concentrações de alcaloides estão na faixa de 0,1 a 0,66% de peso seco (MCKENNA; TOWERS; ABBOT, 1984). No entanto, as concentrações dessas substâncias encontradas na AYA são maiores que as encontradas nas plantas utilizadas para seu preparo (MCKENNA, 2004). Segundo os autores, diferenças nas concentrações e proporções dos alcaloides encontrados nesta bebida, podem estar relacionadas com o método de preparação, a quantidade e proporção das partes das plantas empregadas em seu preparo.

Além disso, Schenberg (2013) faz uma relação hipotética quanto às ações combinadas de β-carbolinas e DMT presentes na AYA ao diminuírem o fornecimento de sangue ao tumor, ativando as vias de apoptose, diminuindo a proliferação celular, e alterando o desequilíbrio metabólico energético das células cancerosas, conhecido como o efeito Warburg. Na literatura, existem alguns trabalhos que demonstram a capacidade das β-carbolinas, principais componentes da AYA, em causar morte celular de diversas células tumorais, como por exemplo, linhagens de leucemia humana (HL60), carcinoma cervical (C33A) e carcinoma hepato celular humano (HepG2) (ZAKER; OODY; ARIMAND, 2007; JIMÉNEZ et al., 2008; CAO et al., 2011).

4. Materiais e métodos

4.1 Ayahuasca e β-carbolinas

A AYA foi preparada e doada pela igreja de Santo Daime de Pelotas-RS. Logo após a chegada do insumo da AYA, foi realizada a caracterização para se obter as características do insumo (dados não mostrados). Para o armazenamento, a bebida foi liofilizada para melhor preservação e então congelada em ultra freezer a -80ºC. As β-carbolinas HRM e HRL foram adquiridas através da empresa Sigma-Aldrich Corporation. Para a realização dos experimentos, tanto a AYA quanto as β-carbonilas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5% e então utilizadas para tratamento das células de glioma de rato C6 e cultura primária de astrócitos.

4.2 Cultivo de linhagem celular

A linhagem de glioma de rato C6 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) e mantidas em meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (pH 7,4) em garrafas de cultivo celular, e mantida em estufa a 5% de CO_2 a 37ºC com atmosfera umidificada.

Após atingir uma confluência de 90%, as células foram lavadas com tampão CMF 1X (NaCl 137mM, KCl 5,36mM, Na_2HPO_4 0,27mM, KH_2PO_4 1,1 mM e glicose 6,1 mM, em pH 7,4), tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e semeadas em uma densidade de $5x10^3$ células por poço (placas de 96 poços). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C durante 24 h até o momento do tratamento.

4.3 Cultivo primário de astrócitos

Para o cultivo primário de astrócitos foram utilizados ratos Wistar recém-nascidos de até 2 dias de vida. O córtex cerebral foi removido, dissociado mecanicamente em CMF 1x. Esse tecido dissociado foi submetido a centrifugação a 1000 g por 5 min. Posteriormente, o *pellet* foi suspenso em DMEM suplementado com 10% de SFB (pH 7,6). Em seguida, as células foram

semeadas em uma densidade de $3x10^4$ por poço (placas de 96 poços), revestida com poli-L-lisina. As culturas foram mantidas em condições padrões de cultivo por 15 dias aproximadamente até atingirem a maturação desejada. Trocas periódicas de meio foram realizadas a cada 5 dias (PEDRA et al., 2018). Todos os procedimentos utilizados no presente estudo seguiram os "Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório" dos Institutos Nacionais de Saúde e foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFPel (CEEA 0055).

4.4 Exposição da linhagem de glioma e cultivo primário de astrócitos à AYA e β-carbonilas

A linhagem de glioma C6 foi submetida ao tratamento com a AYA e β-carbonilas nas concentrações de, 2.5, 5, 10, 25, 50 e 100µg/mL, durante 24, 48 e 72 h. Já o cultivo primário de astrócitos foi exposto aos metabólitos bioativos da AYA e β-carbonilas relacionadas, nas concentrações de 50 e 100µg/mL durante 72 h de tratamento. As células expostas ao DMSO 0,5% foram consideradas controle.

4.5 Teste de Viabilidade por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium)]

No teste de viabilidade celular foi utilizado o corante MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium)], um sal na forma oxidada de coloração amarela que quando reduzido forma cristais de formazan de uma coloração roxa, que é dissolvido é absorvido na região visível e pode ser quantificado por espectrofotometria. Essa coloração é produzida nas mitocôndrias por desidrogenases mitocondriais. Sendo assim esse é um método colorimétrico que avalia a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Neste sentido, após o tratamento, as células foram lavadas com CMF 1x e a solução de MTT foi adicionada em uma concentração de 0,5mg/mL, para então as células serem incubadas por 90min a 37ºC em atmosfera umidificada com 5% de CO_2. Ao fim da incubação, o MTT foi retirado, o precipitado foi eluido em DMSO e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 492nm. Os resultados foram expressos como percentual do controle.

4.5 Análise estatística

Os resultados obtidos através do teste de MTT foram submetidos a análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism 5, e analisados por ANOVA de uma via seguido de post-hoc de Tukey. Dados com valores de $P<0,05$ foram considerados significativos.

5. Resultados e discussão

Determinados relatos de casos disponíveis na literatura apontam interessantes efeitos da AYA na terapia anticâncer (SCHENBERG, 2013). Entretanto, apesar de não haver muitos estudos científicos a respeito da AYA como forma de tratamento alternativo para tumores, as β-carbolinas presentes neste insumo exibem efeitos positivos na diminuição da viabilidade celular em diversos modelos tumorais *in vitro* (ZAKER; OODT; ARIMAND, 2007; CAO et al., 2011; SCHENBERG, 2013). No presente estudo, a caracterização química da AYA por Cromatografia Gasosa demonstrou a presença de 11% de harmina e 2% de harmalina em sua composição (dados não mostrados). Neste contexto, para melhor compreender a atividade antitumoral da AYA, torna-se interessante avaliar o perfil citotóxico deste insumo, assim como da HRM e HRL isoladas, avaliando o papel destas β-carbolinas no potencial efeito da AYA.

Conforme demonstrado na Figura 1, a AYA induziu citotoxicidade de maneira tempo e concentração dependente sobre a linhagem de glioma C6. O insumo reduziu significativamente a viabilidade celular nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL em 10%, 14%, 14%, 17% e 24% respectivamente, após 24 h de tratamento (Figura 1A). No tempo de 48 houve uma diminuição da viabilidade celular nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL em 11%, 18% e 38% respectivamente (Figura 1B), e no tempo de 72 h houve uma diminuição significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 10 µg/mL, sendo essa diminuição de 29%, 47%, 47% e 72% quando comparada ao controle C (Figura 1C).

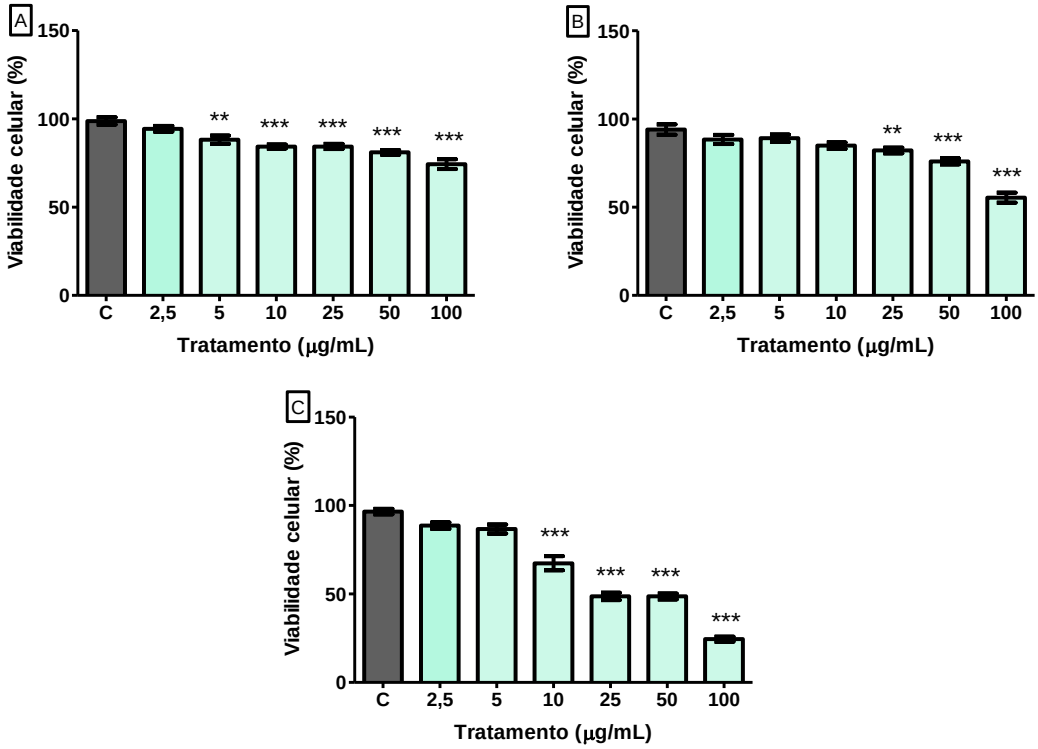

Figura 1. Avaliação da viabilidade celular de linhagem de glioma de rato C6 sobre tratamento com Ayahuasca. A) tratamento após 24 h; B) tratamento após 48 h; C) tratamento após 72 h. Dados expressos como média ± erro padrão, analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. **,***Diferença significativa quando comparado ao controle C (P<0,001 e P<0,0001, respectivamente).

De maneira similar, as β-carbonilas exibiram efeito antiglioma tempo e concentração dependente. Como evidenciado na Figura 2, a HRM diminuiu a viabilidade celular em 17%, 28%, 33%, 42% e 48% respectivamente nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL após 24 h de exposição (Figura 2A), já em 48 h a diminuição nessas mesmas concentrações foram de 18% 27%, 38%, 46%, 54% e 56%, respectivamente (Figura 2B). Por fim, após 72 h de tratamento a harmina inibiu a viabilidade celular em cerca de 19%, 36%, 53%, 59%, e 59% respectivamente, nas concentrações já citadas acima, quando comparado ao grupo controle (C) (Figura 2C).

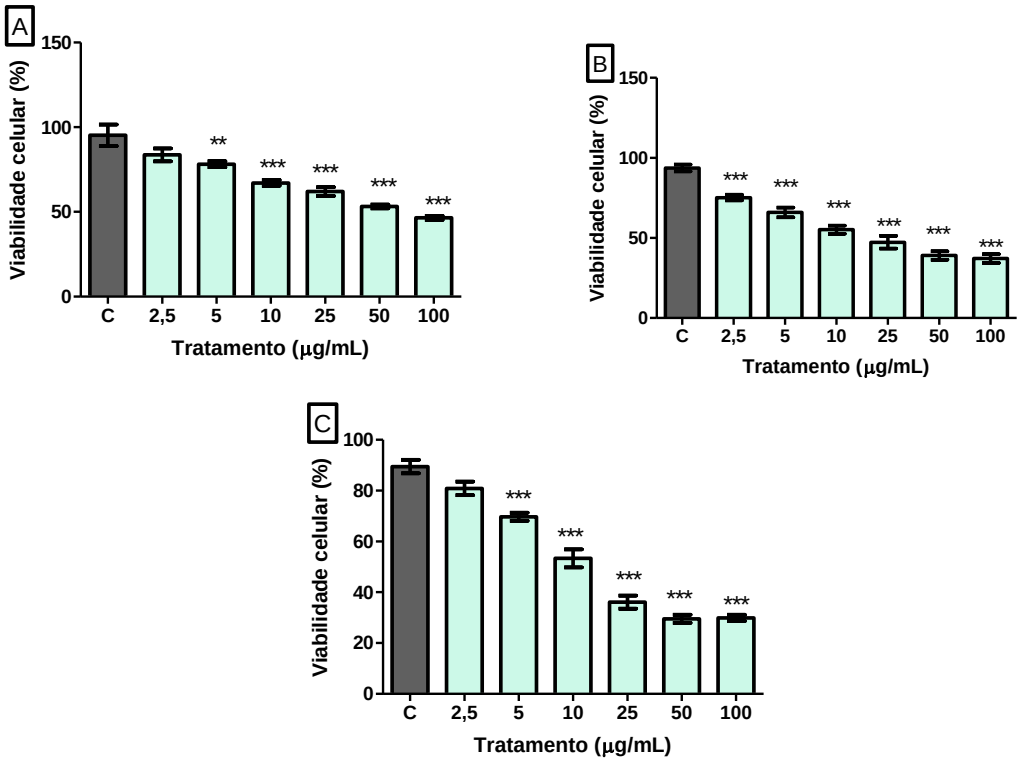

Figura 2. Avaliação da viabilidade celular de linhagem de glioma de rato C6 sobre tratamento com HRM. A) tratamento após 24 h; B) tratamento após 48 h; C) tratamento após 72 h. Dados expressos como média ± erro padrão, analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. **,***Diferença significativa quando comparado ao controle C (P<0.001 e P<0.0001, respectivamente).

Já a HRL, induziu uma redução significativa da viabilidade celular em as concentrações testadas no tempo de 24h sendo essa diminuição de 7%, 12%, 12%, 15%, 28% e 48% nas respectivas concentrações de 2.5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL (Figura 3A). Entretanto nos tempos de 48 e 72 h a diminuição significativa da viabilidade celular ocorreu a partir da concentração de 10 µg/ml, sendo essa diminuição de 15% em 48 h e 24% no tempo de 72 h. Nas demais concentrações (25, 50 e 100 µg/mL) a β-carbonila inibiu a viabilidade celular em 22%, 56% e 61% no tempo de 48h e 60%, 66% e 68% em 72h de tratamento (Figura 3B-C).

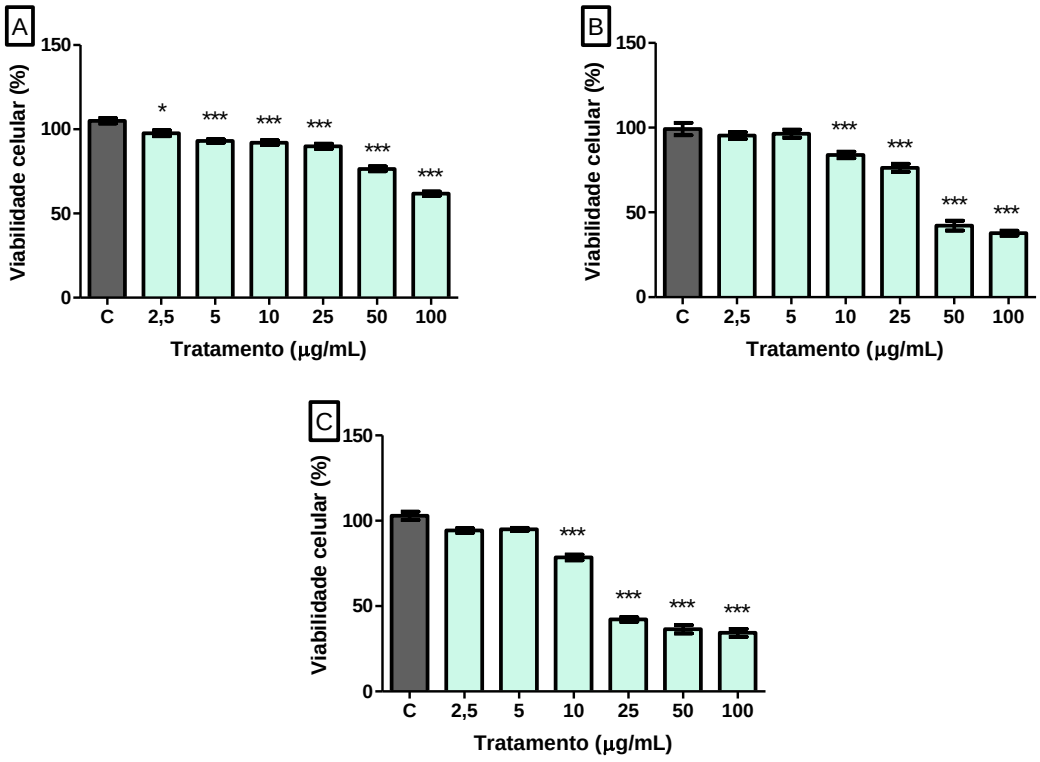

Figura 3. Avaliação da viabilidade celular de linhagem de glioma de rato C6 sobre tratamento com HRL. A) tratamento após 24 h; B) tratamento após 48 h; C) tratamento após 72 h. Dados expressos como média ± erro padrão, analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. *,***Diferença significativa quando comparado ao controle C (P<0,05 e P<0,0001, respectivamente).

Segundo Perdicares e colaboradores (1993), os compostos utilizados na terapia anticâncer afetam tanto as células normais como as tumorais, entretanto, eles desencadeiam maior dano às células neoplásicas do que às dos tecidos normais devido às diferenças existentes entre os processos metabólicos dessas duas populações de células. Assim, os agentes citotóxicos podem não ser letais às células neoplásicas de modo seletivo (PERDICARES et al., 1993; FERNANDES; MELLO, 2010). No presente estudo, tanto a AYA como as β-carbolinas não promoveram qualquer alteração na viabilidade celular do cultivo primário de astrócitos tratados durante 48 ou 72 h quando comparado ao controle (Figura 4). Este achado sugere que tanto AYA como HRM e HML exibem um interessante efeito antiglioma seletivo.

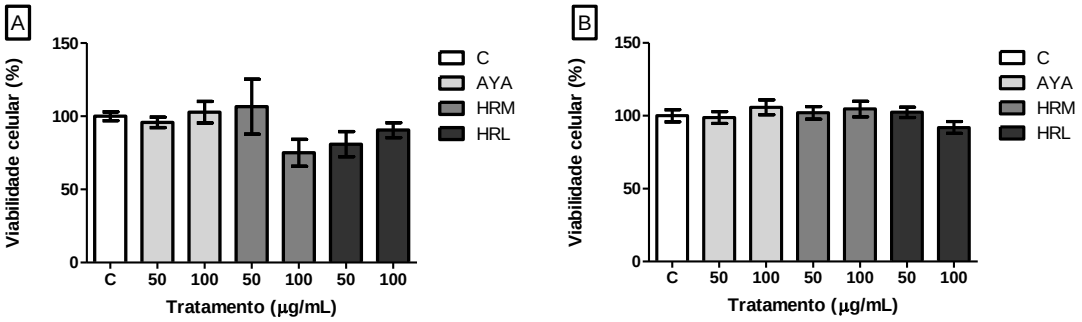

Figura 4. Avaliação da viabilidade celular em Astrócitos de cultivo primário após tratamento com AYA, HRM e HRL. A) tratamento após 48 h; B) tratamento após 72 h. Dados expressos como média ± erro padrão, analisados por ANOVA de uma via seguido de post-hoc de Tukey Os resultados foram considerados significativos quando P<0,05.

Diversos estudos revelam interessantes efeitos citotóxicos das β-carbonilas avaliadas no presente estudo. Zaker, Oodt e Arimand (2007), demonstraram que a harmina e a harmalina foram capazes de induzir morte celular em linhagem de células de Leucemia promielocítica humana (HL60) de maneira concentração dependente. Cao e colaboradores (2011), por sua vez, mostraram que a harmina é citotóxica para linhagens de Carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Já Jiménez e colaboradores (2008) evidenciaram efeito citotóxico de linhagens tumorais humana de carcinoma cervical (HeLa eC33A) expostas a HRM e HRL e carcinoma de cólon (SW480) expostas somente à harmalina. Os autores demonstraram ainda que tanto a HRM quanto a HRL não exibiram efeitos citotóxicos em linhagem de células não transformadas (Fibroblasto - CCD18Lu).

O presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito antitumoral *in vitro* da bebida ritualística e curativa dos povos indígenas provindos da bacia do Amazonas, e também dois de seus componentes mais promissores, a HRM e HRL, β-carbolinas que estão presentes não só no chá de AYA como também em outras plantas utilizadas em diversas culturas como tratamentos de várias doenças graves, como o câncer (LAMCHOURI et al., 1999). Podemos observar nos resultados relatados nesse trabalho que a AYA promoveu uma atividade antitumoral similar à HRM e HRL isoladas, ainda que a quantidade das β-carbolinas utilizadas para o tratamento tenha sido em quantidades maiores

comparadas a quantidade presente no chá de AYA. Além disso, podemos inferir que parte da ação antitumoral da AYA se deve a ação das β-carbolinas presente nela. Não podemos afirmar a extensão da ação das β-carbolinas dentro da AYA no efeito citotóxico em células tumorais de glioma de ratos apresentados nesse estudo, porem sabemos que elas possuem um efeito promissor separadamente e igualmente a AYA.

6. Conclusão

Sabendo que o tratamento para o GBM tem uma baixa eficiência, devido a curta sobrevida dos pacientes, novos compostos capazes de auxiliar e/ou melhorar as possibilidades terapêuticas para esses tumores cerebrais, são necessários.

No presente trabalho pode-se perceber que a AYA e as β-carbolinas HRM e HRL, tiveram um potencial citotóxico bastante promissor em linhagens tumorais de glioma de ratos (C6). Além disso, também foi observado que esses compostos não tiveram efeito tóxicos em células não tumorais, evidenciando assim a capacidade de toxicidade seletiva que a AYA e as β-carbolinas possuem. Sendo assim, os resultados apresentados nesse trabalho demonstram o potencial terapêutico anticâncer da AYA e suas β-carbolinas, HRM e HRL e podem ser importantes em futuros estudos visando a melhora no prognóstico de tumores cerebrais malignos.

.

7. Referencias

ALBERTS, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., ... & Hunt, T. (2010). **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora.

BUTOWSKI, Nicholas A.; SNEED, Patricia K.; CHANG, Susan M. Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 8, p. 1273-1280, 2006.

CAO, Ming-Rong et al. Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 10, n. 6, p. 599-604, 2011.

EFFERTH, Thomas et al. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 8, p. 353-361, 2007.

FANG, Xueping et al. Targeted tissue proteomic analysis of human astrocytomas. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 8, p. 3937-3946, 2012.

FERNANDES, Isaías Cavalcante; MELLO, Adriano Azevedo. Entendendo e combatendo o câncer. **TEMA-Revista Eletrônica de Ciências** (ISSN 2175-9553), v. 7, n. 10/11, 2010.

GABILONDO, Ane M. et al. Monoamine oxidase B activity is increased in human gliomas. Neurochemistry international, v. 52, n. 1-2, p. 230-234, 2008.

GOODENBERGER, McKinsey L.; JENKINS, Robert B. Genetics of adult glioma. Cancer genetics, v. 205, n. 12, p. 613-621, 2012.

HOLLAND, Eric C. Progenitor cells and glioma formation. **Current opinion in neurology**, v. 14, n. 6, p. 683-688, 2001.

INCA. National Cancer Institute. Disponível em:< http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 15 de outubro de 2018.

JIMENEZ, Judith et al. Cytotoxicity of the β-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, n. 4, p. 381-389, 2008.

LAMCHOURI, F. et al. Antitumour principles from Peganum harmala seeds. **Therapie**, v. 54, n. 6, p. 753-758, 1999.

LEFRANC, Florence; BROTCHI, Jacques; KISS, Robert. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. **Journal of clinical oncology**, v. 23, n. 10, p. 2411-2422, 2005.

LOUIS, David N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta neuropathologica, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

LOUIS, David N. et al. 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.

MAHER, Elizabeth A. et al. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. **Cancer research**, v. 66, n. 23, p. 11502-11513, 2006.

MCKENNA, Dennis J.; CALLAWAY, James C.; GROB, Charles S. The scientific investigation of Ayahuasca: a review of past and current research. **The Heffter Review of Psychedelic Research,** v. 1, n. 65-77, p. 195-223, 1998.

MOSMANN, Tim. 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.

MRUGALA, Maciej M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. **Discovery medicine**, v. 15, n. 83, p. 221-230, 2013.

NEWLANDS, E. S. et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical

properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer treatment reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-61, 1997.

OSTROM, Quinn T. et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. **Neuro-oncology**, v. 16, n. 7, p. 896-913, 2014.

PEDRA, Nathalia Stark et al. Endophytic fungus isolated from Achyrocline satureioides exhibits selective antiglioma activity–the role of Sch-642305. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 476, 2018.

PERDICARIS, Antônio André Magoulas et al. Controle do câncer: uma proposta de integraçäo ensino-serviço. In: **Controle do câncer: uma proposta de integraçäo ensino-serviço**. 1993.

PIRES, Ana Paula Salum; OLIVEIRA, Carolina Dizioli Rodrigues; YONAMINE, Mauricio. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 1, p. 15-23, 2010.

RIEMENSCHNEIDER, Markus J. et al. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. **Acta neuropathologica**, v. 120, n. 5, p. 567-584, 2010.

SCHENBERG, Eduardo E. Ayahuasca and cancer treatment. **SAGE open medicine**, v. 1, p. 2050312113508389, 2013.

STUPP, R. et al. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology**, v. 21, n. suppl 5, p. v190- v193, 2010.

VAN MEIR, Erwin G. et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. CA: **a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-193, 2010.

WEN, Patrick Y.; KESARI, Santosh. Malignant gliomas in adults. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 5, p. 492-507, 2008.

ZAKER, Farhad; OODY, Arezo; ARJMAND, Alireza. A study on the antitumoral

and differentiation effects of Peganum harmala derivatives in combination with ATRA on leukaemic cells. **Archives of pharmacal research**, v. 30, n. 7, p. 844-849, 2007.