

Estudo *in vitro* do efeito da suplementação com leucina e extrato hidroetanólico de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) na modulação dos efeitos da caquexia do câncer

Palavras-Chave: Caquexia-1, Suplementação Nutricional-2, Compostos bioativos-3

REZENDE, G. G. S., IB - UNICAMP;

FERREIRA, I. C., IB – UNICAMP (co-orientador);

Prof. Dr SALVADOR, M.J., IB – UNICAMP

Prof^a. Dr^a GOMES-MARCONDES, M.C.C., IB UNICAMP (orientador)

INTRODUÇÃO:

O câncer é considerado a segunda causa de mortes em todo mundo, com aumento crescente a cada ano no número de novos casos (WHO, 2022), sendo que um dos efeitos adverso desta patologia é a caquexia. Podendo afetar até 80% dos pacientes dependendo do tipo e do estágio avanço da doença (Siegel *et al*, 2023; Baracos, *et al.*, 2018), a caquexia é caracterizada como síndrome multifatorial, que está associada principalmente com a perda de massa muscular esquelética. A intensa espoliação proteica do músculo esquelético altera muitas vias metabólicas, como também ativa a apoptose e diminui a sua regeneração (Fearon *et al.*, 2010).

Atualmente, além das terapias convencionais, estão sendo investigadas terapias coadjuvantes, na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos pacientes com câncer. A leucina por exemplo, é um aminoácido essencial empregado para a sinalização do processo de síntese de proteína e também é uma molécula que promove o metabolismo energético (Duan *et al.*, 2016). Na literatura, trabalhos que relataram o potencial da leucina na caquexia do câncer em ensaios pré-clínicos (Viana *et al.*, 2021; Cruz *et al.*, 2020), demonstrando que novos estudos devem ser realizados utilizando a leucina com novas abordagens nutricionais.

Importantes resultados estão sendo encontrados ao estudar a composição fitoquímica de frutas, como a acerola. Os fitoquímicos são definidos como conjunto de substâncias que conferem diversos benefícios à saúde humana, pois agem modulando uma ou mais vias metabólicas no organismo (Abuajah *et al*, 2015). No caso da acerola, compostos como o ácido ascórbico e substâncias fenólicas pertencentes às famílias das antocianinas, flavononas e flavonóis têm sido reportados como os responsáveis por suas propriedades biológicas, entre elas a alta capacidade antioxidante (Ferreira *et al.*, 2021; Nascimento *et al.*, 2018). Estudos relatam que o estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento dos tumores, visto que a sobrevivência e a proliferação das células cancerígenas,

ocorrem em condições de desequilíbrio redox, gerado pela produção excessiva das EROs (Deberardinis e Chandel, 2016).

Sabendo que a caquexia no câncer é uma condição debilitante grave e que influencia na resposta do paciente ao tratamento, torna-se necessário investigar terapias coadjuvantes que minimizem a atividade das células neoplásica sem causar danos na célula muscular. Por esta razão, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar se o extrato hidroetanólico de acerola da variedade BRS Sertaneja, em conjunto com o aminoácido leucina pode apresentar efeito modulador sobre a célula muscular, quanto aos efeitos da evolução tumoral, em ensaios *in vitro*.

METODOLOGIA:

Material Vegetal e preparação do extrato hidroetanólico

Frutos de acerola da variedade BRS Sertaneja, foram cultivados no campo experimental Bebedouro da Embrapa Semiárido (latitude 09°08'S; longitude 40°18'W; altitude 365,5 m), Petrolina, PE, Brasil. Foram colhidos no período da manhã nos meses de janeiro e fevereiro no ano de 2023. Os frutos foram congelados e liofilizados até a obtenção de pó homogêneo. A partir deste pó, o extrato hidroetanólico de acerola (EHA) foi preparado seguindo a metodologia descrita por Cruz *et al.* (2019) com modificações. O EHA foi embalado a vácuo e armazenado a -80°C até a realização das análises.

Caracterização química por HPLC

A quantificação das substâncias fenólicas foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC/DAD), empregando o método descrito por Padilha *et al.* (2017), com adaptações feitas por Dutra *et al.* (2018). As condições experimentais seguiram o protocolo estabelecido por Ferreira *et al.* (2021). O teor de ácido ascórbico total foi determinado pelo método de Tillman, utilizando 2,6-diclorofenol-indofenol (DFI) e os resultados expressos em porcentagem (Strohecker; Henning, 1967).

Avaliação da Citotoxicidade das células L6

O ensaio de citotoxicidade foi avaliado utilizando células musculares L6 (mioblasto de ratos) pelos ensaios de MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e vermelho neutro, seguindo as metodologias descritas por Riss *et al.* (2016) e Borenfreund; Puerner (1985), respectivamente. As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço, e submetidas a diferentes concentrações, em três tratamentos, sendo: extrato (de 5 a 4000 µg/mL), leucina (de 10 a 1000 µM) e líquido ascítico (de 1 a 20%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Substâncias majoritárias do extrato hidroetanólico de acerola

A natureza química das substâncias fenólicas do extrato hidroetanólico de acerola foi analisada em RP-HPLC/DAD por comparação com padrões externos. Identificaram-se, no total, 42 substâncias fenólicas, das quais 26 foram quantificadas. Entre estas, destacam-se a antocianina *cianidina 3-ramnosídeo* e o flavonol *kaempferol 3-glucosídeo*, apresentando concentrações de 1469,02 mg kg⁻¹ e

1179,52 mg kg⁻¹, respectivamente. Esses valores correspondem a 35,1% e 28,2% do total de fenólicos quantificados, que foi de 4180,3 mg.kg⁻¹ (Tabela 1). Além destes, a principal substância identificada foi o ácido ascórbico com média de 20,8%.

Tabela 1: Substâncias majoritárias identificadas no extrato hidroetanólico liofilizado de acerola da variedade BRS Sertaneja.

Substâncias Majoritárias	
Kaempferol 3-glucoside ¹ (mg kg ⁻¹)	1179,52 ± 62,12
Cyanidin 3-rhamnoside ¹ (mg kg ⁻¹)	1469,02 ± 11,77
Ácido ascórbico ² (%)	20,78 ± 0,68

Legenda: ¹Conteúdo fenólico detectado por HPLC. ²Ácido ascórbico quantificado pelo método de Tillmans.

Ensaio de viabilidade celular

Os resultados do teste de viabilidade celular das células L6 em diferentes tratamentos (leucina, líquido ascítico e extrato hidroetanólico de acerola, por 24 horas)(Figura 1), mostraram a citotoxicidade dos diferentes tratamentos, avaliados pelos ensaios: MTT e vermelho neutro, os quais examinam a funcionalidade mitocondrial e a atividade lisossomal, respectivamente.

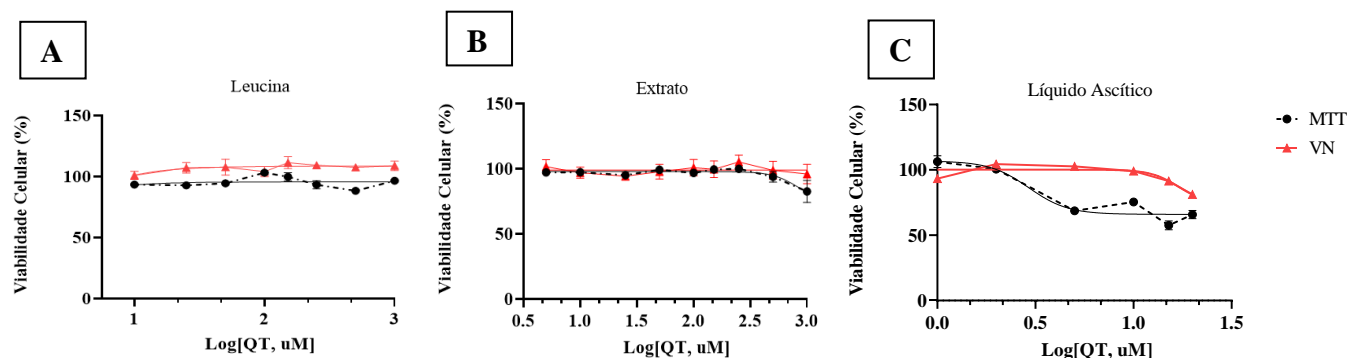


Figura 1. Viabilidade celular das células L6 em função dos diferentes tratamentos. Análises pelos ensaios de MTT (preto) e Vermelho Neutro (vermelho) tratadas com o aminoácido leucina (A), extrato de acerola (B) e líquido ascítico (C).

Considerando os diferentes métodos, observou-se que as curvas A e B para ambos os ensaios foram similares, apesar de possuírem mecanismos de análise diferentes. Apenas para a curva do tratamento com líquido ascítico (C) houve pequena discrepância entre os métodos, mas apresentaram o mesmo comportamento.

Em relação as concentrações testadas, não houve diferença significativa na viabilidade das células L6 tratadas com o aminoácido leucina nos dois testes (Tabela 2), diferentemente dos tratamentos com o EHA e o líquido ascítico. As últimas concentrações (2000, 3000 e 4000 µg mL⁻¹) do EHA para o teste MTT apresentaram média em torno de 70% de viabilidade, no entanto para o teste de vermelho neutro, as duas últimas concentrações induziram redução de cerca de 50% (Tabela 3).

Tabela 2. Viabilidade celular das células L6 para os ensaios de MTT e Vermelho Neutro tratadas com o aminoácido leucina.

Viabilidade das células L6		
Concentração (µM)	Ensaio	
	MTT	Vermelho Neutro
10	93,44 ± 2,87 a	100,95 ± 5,91 a
25	92,75 ± 0,10 a	107,19 ± 7,41 a
50	94,41 ± 4,06 a	107,65 ± 11,24 a
100	103,20 ± 2,13a	104,80 ± 7,17 a
150	99,78 ± 5,95 a	111,44 ± 8,47 a
250	93,25 ± 6,01 a	109,37 ± 1,91 a
500	88,30 ± 2,85 a	107,55 ± 5,09 a
1000	96,59 ± 2,16 a	108,84 ± 6,72 a

Legenda: Médias dos tratamentos seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Tabela 3. Viabilidade celular das células L6 para os ensaios de MTT e Vermelho Neutro tratadas com o extrato hidroetanólico de acerola.

Viabilidade das células L6		
Concentração (µg mL ⁻¹)	Ensaio	
	MTT	Vermelho Neutro
5	97,17 ± 0,63 a	101,58 ± 9,35 a
10	97,30 ± 2,70 a	96,90 ± 7,33 a
25	95,03 ± 4,09 ab	94,27 ± 5,47 a
50	99,19 ± 2,69 a	97,65 ± 9,79 a
100	96,81 ± 3,85 a	100,83 ± 10,95 a
150	99,39 ± 4,95 a	99,61 ± 11,22 a
250	99,96 ± 0,35 a	105,24 ± 9,09 a
500	93,81 ± 7,08 ab	98,83 ± 11,96 a
1000	82,53 ± 14,81 bc	95,90 ± 12,76 a
2000	73,29 ± 9,08 c	90,15 ± 9,29 a
3000	73,21 ± 1,41 c	57,57 ± 1,60 b
4000	76,05 ± 1,47 c	58,05 ± 0,54 b

Legenda: Médias dos tratamentos seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Este comportamento também foi observado no tratamento com líquido ascítico proveniente de ratos portadores do tumor carcinossarcoma de *Walker-256* (Tabela 4), demonstrando possíveis danos nas células musculares L6, como fator indireto da evolução tumoral. Isso pode ser explicado, pois as células neoplásicas liberam mediadores inflamatórios que ativam vias de degradação (Baracos *et al.*, 2018). Este ensaio foi realizado para mimetizar a situação *in vivo* de evolução tumoral e desenvolvimento da caquexia, por isso a importância e a utilização deste material como um dos tratamentos.

Tabela 4. Viabilidade celular das células L6 para os ensaios de MTT e Vermelho Neutro tratadas com o líquido ascítico.

Viabilidade das células L6		
Concentração (%)	Ensaio	
	MTT	Vermelho Neutro
1	106,33 ± 7,82 a	93,35 ± 2,13 ab
2	100,52 ± 1,27 a	104,49 ± 2,38 a
5	68,74 ± 3,44 bc	102,69 ± 2,34 a
10	75,40 ± 0,16 b	99,02 ± 2,26 ab
15	57,57 ± 5,95 c	91,47 ± 1,91 ab
20	65,87 ± 5,58 bc	81,16 ± 0,61 b

Legenda: Médias dos tratamentos seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

CONCLUSÕES

Nossos estudos de viabilidade celular mostraram que tanto o EHA, quanto o líquido ascítico, podem causar citotoxicidade nas células musculares L6, quando em altas concentrações. Enquanto, a

leucina, independente das concentrações testadas, não apresentou citotoxicidade significativa. Esses achados indicam a necessidade de avaliações cuidadosas das doses de EHA, para que possamos obter efeitos modulatórios e positivos quanto aos compostos bioativos, tais como os fenólicos e o ácido ascórbico, sobre as células musculares. Também, mostram a importância de mimetizar as condições *in vivo*, quando há evolução tumoral (ensaio utilizando líquido ascítico), para análise abrangente dos efeitos dos tratamentos sobre as células musculares, especialmente no contexto da evolução ou estabelecimento da caquexia. Portanto, ao investigar as aplicações terapêuticas do EHA, é crucial considerar tanto a sua composição química rica em substâncias bioativas, quanto o seu potencial citotóxico. Da mesma forma, a utilização da leucina quanto à efeitos terapêuticos parece oferecer melhores resultados, pois mostra ser mais segura nas doses estudadas. Assim, tratamentos coadjuvantes, como a utilização do EHA associado a leucina, podem minimizar os efeitos da evolução tumoral sobre as células musculares.

BIBLIOGRAFIA

- ABUJAH, C. I; et al. **Functional components and medicinal properties of food: a review.** *Journal of food science and technology*, v. 52, n. 5.
- BARACOS, V.E. et al. **Cancer-associated cachexia.** *Nat Rev Dis Primers*, v. 4, n.17105, 1-18, 2018.
- BORENFREUD, E.; PUERNER, J. A. **Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption.** *Toxicology letters*, v. 24, n. 2-3, p. 119-124, 1985.
- CRUZ, R. G. et al. **Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts.** *Food Chemistry*, v. 277, p. 698-705, 2019.
- DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. **Fundamentals of cancer metabolism.** *Science advances*, v. 2, n. 5, 2016.
- DUAN, Y. et al. **The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism.** *Amino acids*, v. 48, n. 1, p. 41-51, 2016.
- DUTRA, M. C. P. et al. **Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn.** *Food Chemistry*, 269, 157–165. 2018.
- FEARON, K. et al. **Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus.** *The lancet oncology*, v. 12, n. 5, p. 489-495, 2011.
- FERREIRA, I. C. et al. **Brazilian varieties of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) produced under tropical semi-arid conditions: Bioactive phenolic compounds, sugars, organic acids, and antioxidant capacity.** *Journal of Food Biochemistry*, v. 45, n. 8, 2021.
- NASCIMENTO, E. M.M. et al. **HPLC and in vitro evaluation of antioxidant properties of fruit from *Malpighia glabra* (Malpighiaceae) at different stages of maturation.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 119, p. 457-463, 2018.
- PADILHA, C.V.S., et al. **Effects of successive harvesting in the same year on quality and bioactive compounds of grapes and juices in semi-arid tropical viticulture.** *Food Chemistry*, v. 301, p. 125170, 2019.
- RISS, T. L. et al. **Cell viability assays.** *Assay guidance manual [Internet]*, 2016.
- SIEGEL R.L., et al. **Cancer statistics, 2023.** *CA Cancer J Clin.* 73(1):17-48, 2023.
- STROHECKER, R.; Henning, H.M. (1967). **Análises de vitaminas: métodos comprovados.** Paz Montolvo, Madrid, pp. 428p.
- VIANA, L. R. et al. **Leucine-Rich Diet Improved Muscle Function in Cachectic Walker 256 Tumour-Bearing Wistar Rats.** *Cells*, v. 10, n. 12, 2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em 12 de abril de 2023.