



CO-TRATAMENTO COM TEMOZOLAMIDA E CELECOXIBE INDUZ APOPTOSE NA LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA HUMANO U-251MG

Gabrielle Cosme Coelho¹
Felipe Umpierre Conter²
Ivana Grivicich³

Resumo

O câncer é considerado um dos principais problemas de saúde no mundo, contabilizando 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em 2013. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes (Brasil) em 2014, a incidência de neoplasias que compreendem o Sistema Nervoso Central (SNC) chegou a 5,1 casos para cada 100 mil homens, e a 4,0 casos para cada 100 mil mulheres em todo o Brasil. Entre os tumores do SNC o Glioblastoma Multiforme (GBM) é o mais comum e agressivo e seu tratamento geralmente envolve ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A Temozolamida (TMZ) é o principal quimioterápico utilizado para esse tipo de neoplasia. Diversos agentes farmacológicos vem sendo utilizados associados ao TMZ, com o objetivo de melhorar as respostas. O presente trabalho tem como objetivo investigar o potencial dos tratamentos isolados e combinados entre os quimioterápicos TMZ e Celecoxibe (CLX) quanto a melhor sequência de administração dos fármacos (co-tratamento ou pré-tratamento), indução de citotoxicidade e de apoptose. Os resultados mostraram que no protocolo de co-tratamento que o CLX potencializou a ação da TMZ. O *western blotting* demonstrou que o co-tratamento ativou a via de apoptose mediada pela caspase 3. A partir destes resultados, percebeu-se que a melhor forma de tratamento seria o co-tratamento, utilizando os dois fármacos juntos para obter um melhor efeito antitumoral, o que eventualmente pode ser de interesse clínico como alvo de futuras terapias contra GBM.

Palavras-chave: Temodozolamida; Celecoxibe; Apoptose, Caspase-3, Glioblastoma multiforme.

INTRODUÇÃO

Para 2016, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva estimou que a incidência de neoplasias que compreendem o SNC chegasse a 5,4 casos para cada 100 mil homens, e a 4,8 casos para cada 100 mil mulheres em todo o Brasil. Quando consideramos apenas os resultados por estado, os dados do Rio Grande do Sul são mais elevados, chegando a 11,45 novos casos para cada 100 mil homens e 9,29 casos para cada 100 mil mulheres, o que coloca o estado como o primeiro colocado em incidências desse tipo de neoplasia (INCA, 2016).

De todas os tipos de câncer que acometem o sistema nervoso central, o mais comum e o mais letal é o Glioblastoma Multiforme (GBM). Devido a características como alta capacidade mitótica, proliferação microvascular (angiogênese), presença de áreas necróticas e crescimento infiltrativo, são extremamente difíceis de tratar, apresentando um baixo prognóstico com uma sobrevivência média de apenas um ano após diagnóstico (OHGAKI et

1 Aluno do Ensino Médio – Bolsista PIBIC/EM-CNPq – gabicosme.coelho@gmail.com

2 Aluno de doutorado do PPPGBIOSAÚDE – Bolsista CAPES/PROSUP - lipebtbf@gmail.com

3 Professor do curso de Medicina e do PPGGBIOSAÚDE – grivicich@terra.com.br

al., 2007). Os sintomas que mais se manifestam a esses casos são déficit neurológico, cefaleia, alterações visuais e quadros de convulsão (BRANDES et al., 2008). Geralmente tardio, o diagnóstico de imagem por ressonância magnética (RM) de contraste é uma das mais utilizadas. Se mostrando mais eficiente que o uso de tomografia computadorizada, o uso do contraste permite que a RM conceba a visualização diagnóstica de pequenos tumores e detalhamentos que se ocultam na tomografia computadorizada (LACROIX et al., 2001). Uma vez diagnosticado, a ressecção cirúrgica é a primeira instância para remoção do tumor. No entanto, a maioria dos diagnósticos confirma a presença da neoplasia em estágio mais avançado. Isso implica que a célula tumoral já acometeu tecidos adjacentes, tornando a ressecção completa inviável. Assim, o uso de radioterapia concomitante com quimioterapia são a próxima alternativa (VAN NIFTERIK, 2011).

Atualmente, o quimioterápico de escolha para tratamento de GBM é o Temozolomida (TMZ), um agente alquilante imidazotetracênico, com atividade antitumoral, que sofre transformação química rápida na circulação sistêmica em pH fisiológico, formando o composto ativo que intercala o DNA, alquilando posição O6 e N7 da guanina. Essa intercalação é suficiente para desencadear processo de morte celular programada por apoptose (CLARK et al., 2017). Apesar da eficiência da TMZ, o câncer tem como uma de suas características mais marcantes a capacidade de se adaptar e gerar resistência. Para tentar contornar isso, as terapias para tratamentos de glioblastomas incluem uma combinação de quimioterápicos como estratégias para aumentar a efetividade contra os GBM (STOCKHAMMER et al., 2009). Levando em consideração que a maioria dos GBM superexpressam a proteína ciclooxygenase-2 (COX-2), o uso de inibidores seletivos para essa glicoproteína se apresenta como alternativa terapêutica para sobrepujar mecanismos de resistência e aumentar a eficácia do tratamento com quimioterápico (QUI et al., 2017).

Entre outros medicamentos utilizados na terapia antitumoral, podemos citar os inibidores de COX-2 como uma classe de interesse para tratamento combinado contra o GBM. O CLX é um inibidor seletivo da COX-2, pertencente à classe dos anti-inflamatórios não-esteroidais que geralmente é utilizado para tratamento de osteoartrite e artrite reumatoide (STOCKHAMMER et al., 2009). Testes pré-clínicos realizados mostram que a inibição da COX-2 pode induzir a apoptose, potencializar citotoxicidade da quimioterapia, antagonizar a anfigênese, e prejudicar a migração celular (KANG et al., 2006; HIDA et al., 2011; QIU et al., 2017). O CLX tem sua capacidade apoptótica associada com a ativação de moléculas pró-apoptóticas como as caspases e a inibição de moléculas anti-apoptóticas como a PDK1 e AKT1. Além de estar diretamente envolvido na expressão de inibidores de ciclo celular como p21, p27 e o decrescimento na expressão das ciclinas (GONG et al., 2012).

O presente trabalho tem como objetivo investigar o potencial dos tratamentos isolados e combinados entre os quimioterápicos TMZ e Celecoxibe (CLX) quanto a melhor sequência de administração dos fármacos (co-tratamento ou pré-tratamento), indução de citotoxicidade e de apoptose

METODOLOGIA

A linhagem de glioblastoma multiforme humano U-251MG, obtida do American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), foi mantida em meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) contendo 2% (p/v) L-glutamina e 15% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; CULTILAB, SP, Brasil), a temperatura de 37°C, umidade relativa mínima de 95% e atmosfera de 5% de CO₂ no ar.

Inicialmente, a linhagem celular U-251MG foi tratada com doses seriadas, obtidas a partir de um estudo piloto, de CLX (2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 160 µM) ou TMZ (10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM, 500 µM) por 72 h. Vinte e quatro horas antes dos tratamentos, as células foram incubadas em microplacas de 96 poços, em uma

densidade de 4×10^4 células/100µL/poço. Cada experimento incluiu um controle contendo células somente com meio de cultura e um controle sem células. A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de Sulforodamida B (SRB) (SKEHAN et al., 1990). A SRB solubilizada foi acessada colorimetricamente utilizando um leitor de microplacas (Multiskan Uniscence) em comprimento de onda de 540 nm. A partir deste ensaio os valores de IC₅₀ (quantidade de fármaco necessária para inibir 50% do crescimento celular) foram determinados. A seguir os fármacos foram combinados e avaliados com SRB.

A apoptose foi avaliada pela expressão proteica de caspase-3. A caspase3 é uma das enzimas efetoras da apoptose. A sua ativação requer uma proteólise da sua forma inativa (35 kDa) originando a caspase-3 ativada (17 kDa) (Lavrik et al., 2005). Após os mesmos tratamentos acima mencionados, as células serão removidas dos frascos de cultura por tripsinização e a expressão proteica da caspase-3 (ativa e inativa) realizada através de *western blotting* (CAVALCANTE JÚNIOR et al., 2004; TENTORI et al., 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da citotoxicidade foi utilizada para determinar a dose de inibição de 50% do crescimento celular (IC₅₀) em cultura, utilizando a curva de dose-resposta gerada a partir exposição dos quimioterápicos por 72 h (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados por SHEN et al. (2014) em linhagem de glioblastoma humano *in vitro*, onde o tratamento isolado da TMZ por 72 h, mostrou redução de 72,4% no crescimento celular.

A seguir analisamos o crescimento celular após o tratamento com TMZ e as duas drogas juntas seguindo os protocolos de pré-tratamento e co-tratamento. Quando utilizado somente TMZ a dose necessária para inibir 50% do crescimento celular foi de 373,7 µM, enquanto que no pré-tratamento foi de 321,6 µM e no co-tratamento 201,7 µM. Comparando os resultados de IC₅₀ da TMZ sozinha e do pré-tratamento, podemos dizer que não houve uma diferença significativa entre os valores de IC₅₀ (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de IC₅₀ (µM; média ± DP, n = 6) na linhagem celular de glioblastoma humano U-251MG após tratamento por 72 h com CLX ou TMZ, ou nas combinações e sequências indicadas. Onde, CLX = Celecoxibe, TMZ = Temozolomida, CLX+TMZ = Celecoxibe IC₅₀ e Temozolomida co-tratamento e CLX>TMZ = Celecoxibe IC₅₀ 24 h e Temozolomida 48 h pré-tratamento.

	IC ₅₀ (µM)
CLX	25,0 ± 1,7
TMZ	373,7 ± 40,0
CLX + TMZ	201,7 ± 8,0*
CLX > TMZ	321,6 ± 14,8

* Estatisticamente diferente do TMZ isolado (Anova; p < 0,05).

A marcação para forma inativa da enzima (pró-caspase-3; 34 kDa) foi observada em todas as amostras analisadas (Figura 2). A quantificação do gel mostrou que as células expostas ao CLX ou TMZ isolados não apresentou diferença significativa em relação ao controle não tratado. Por outro lado, no co-tratamento pode se vislumbrar uma redução de aproximadamente 30% da expressão de pró-caspase-3 em relação a controle não tratado e no pré-tratamento essa redução foi de 5% (Anova; p < 0,05).

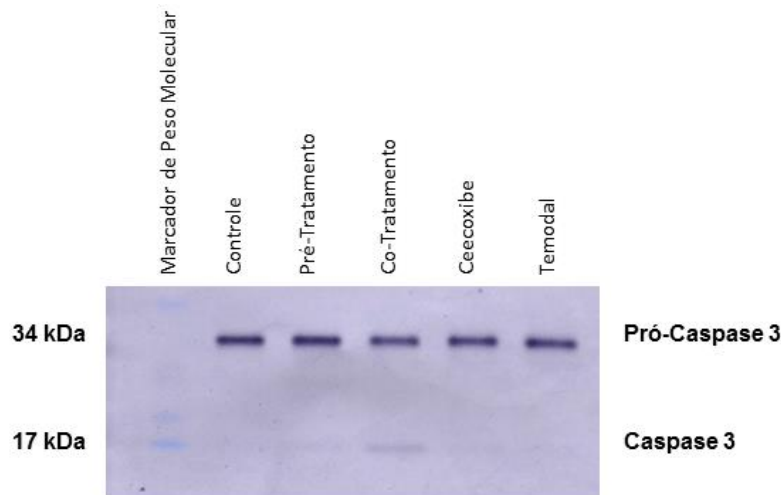


Figura 1. Fotografia representativa de membrana de nitrocelulose para avaliação da expressão de caspase-3 no controle não tratado pré tratamento, co-tratamento, CLX isolado e TMZ isolado.

Ao observarmos o gel (Figura 1), percebe-se, também, a marcação da forma ativa da enzima (caspase-3; 17 kDa) na linhagem exposta ao co-tratamento e ao pré-tratamento, o que sugere a ativação de via apoptótica por Caspase-3. Nota-se, porém, que a expressão da caspase-3 (ativada) foi maior (aproximadamente 6 vezes) no co-tratamento em relação pré-tratamento. Esses resultados refletem o efeito aditivo e sinérgico entre os quimioterápicos, assim como a capacidade de inibir o crescimento celular. Esses resultados ajudam há esclarecer um pouco o mecanismo de ação potencializado pela combinação entre o CLX e TMZ. Nesse sentido, KNIZHNIK et al (2013) demonstram que o potencial citotóxico da TMZ pode estar associado também a via de ativação de caspase 3, uma vez que a célula não consegue desfazer os erros de pareamento na O6-metilguanina, levando a formação de lesões no DNA, bloqueando o processo de replicação e causando quebras de dupla fita.

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que a combinação dos dois agentes, demonstrou uma potencialização na citotoxicidade com o co-tratamento em relação a TMZ isolada e ao pré-tratamento. Além disso, o efeito do co-tratamento parece estar associado com a indução de apoptose, uma vez que a expressão de caspase-3 foi aproximadamente 6 vezes maior no co-tratamento em relação pré-tratamento.

REFERÊNCIAS

- BRANDES, A.A.; TOSONI, A.; FRANCESCHI, E.; RENI, M.; GATTA, G.; VECHT, C. Glioblastoma in adults. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 67, p. 139-152. 2008.
- CLARK, P.A.; GAAL, J.T.; STREBE, J.K.; PASCH, C.A.; DEMING, D.A.; KUO, J.S.; ROBINS, H.I. The effects of tumor treating fields and temozolomide in MGMT expressing and non-expressing patient-derived glioblastoma cells. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 36, p. 120-124, 2017.
- GONG, L.; THORN, C.F.; BERTAGNOLLI, M.M.; GROSSER, T.; ALTMAN, R.B.; KLEIN, T.E. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacogenetics and Genomics**. n. 22, v. 4, p. 310- 318. 2012.

HIDA, T.; KOZAKI, K.; MURAMATSU, H.; MASUDA, A.; SHIMIZU, S.; MITSUDOMI, T.; SUGIURA, T.; OGAWA, M.; TAKAHASHI, T. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. **Clinical Cancer Research**, n. 6, p. 2006-2011. 2000.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. Acesso em 18 maio. 2017.

KANG, S.G.; KIM, J.S.; PARK, K.; KIM, J.S.; GROVES, M.D.; NAM, D.H. Combination celecoxib and temozolomide in c6 rat glioma orthotopic model. **Oncology Reports**, v. 15, p. 7-13. 2006.

KNIZHNIK, A.V.; ROOS, W.P.; NIKOLOVA, T.; QUIROS, S.; TOMASZOWSKI, K.; CHRISTMANN, M.; KAINA, B. Survival and Death Strategies in Glioma Cells: Autophagy, Senescence and Apoptosis Triggered by a Single Type of Temozolomide-Induced DNA Damage. **PLoS One**, v.8, p. e55665. 2013

LACROIX, M.; ABI-SAID, D.; FOURNEY, D.R.; GOKASLAN, Z.L.; SHI, W.; DEMONTE, F.; LANG, F.F.; MCCUTCHEON, I.E.; HASSENBUSCH, S.J.; HOLLAND, E.; HESS, K.; MICHAEL, C.; MILLER, D.; SAWAYA, R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **Journal of Neurosurgery**, v. 95, v. 2, p. 190-198. 2001.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **American Journal of Pathology**, v. 170, p. 1445-1453. 2007

QIU, J.; SHI, Z.; JIANG, J. Cyclooxygenase-2 in glioblastoma multiforme. **Drug Discovery Today**, v. 22, p. 148-156, 2017.

SHEN, W.; HU, J.; ZHENG, J.S. Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. **Journal of International Medicine Resesearch**, v. 42, p. 164-172. 2014.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. New colorimetric assay for anticancer drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 1107-1112, 1990.

STOCKHAMMER, F.; MISCH, M.; KOCH, A.; CZABANKA, M.; PLOTKIN, M.; BLECHSCHMIDT, C.; TUETTENBERG, J.; VAJKOCZY, P. Continuous low-dose temozolomide and celecoxib in recurrent glioblastoma. **Journal of Neurooncology**, v. 100, p. 407-415. 2010.

VAN NIFTERIK, K.A.; VAN DEN BERG, J.; SLOTMAN, B.J.; VAN RIJN, J. Anti-tumour effects by a trimodal combination of temozolomide, meloxicam and X-rays in cultures of human glioma cells. **International Journal of Radiation Biology**, v. 87, p. 192-201. 2011.