



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

Gabrielle C. Cosme¹, Felipe U. Conter²
Orientadora: Dra. Ivana Grivicich³

¹Acadêmica do Ensino Médio, Iniciação Científica Júnior CNPq no Laboratório de Biologia do Câncer, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; ²Doutorando do Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; ³Professora do Curso de Biomedicina e Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Coordenadora do Laboratório de Biologia do Câncer, ULBRA

INTRODUÇÃO

Como uma das principais causas de morte no mundo, o câncer é cada vez mais estudado em busca de tratamentos e terapias. Dos tumores do Sistema Nervoso Central, o Glioblastoma Multiforme (GBM) é o mais comum e agressivo, seu tratamento geralmente envolve ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A Temozolomida (TMZ) é o principal quimioterápico utilizado para esse tipo de neoplasia.

Em estágios mais avançados, onde o GBM já encontra-se em tecido adjacente, a ressecção cirúrgica não mais se apresenta como uma forma viável de tratamento, o que resulta no tratamento apenas com o quimioterápico. Apesar da eficácia da TMZ, células neoplásicas possuem capacidade de se adaptarem, desenvolvendo formas de se tornarem resistentes. Assim, a busca por terapias adicionais visa aumentar a eficácia terapêutica, combinando quimioterápicos para tal. O Celecoxibe (CLX) é um inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (COX-2). Em tumores de sistema nervoso central já foi detectado uma maior expressão de prostaglandinas por conta da super expressão de COX-2, o que justificaria o uso de Inibidores de COX-2 como o CLX para redução da proliferação de linhagens celulares de GBM.

Terapias onde se administram fármacos com princípios ativos diferentes podem apresentar melhores resultados, diminuindo a resistência dos tumores.

OBJETIVO

Investigar o potencial dos tratamentos isolados e combinados entre TMZ e CLX quanto a melhor sequência de administração dos fármacos (co-tratamento ou pré-tratamento), indução de citotoxicidade e de apoptose.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTIVO E MANUTENÇÃO DA LINHAGEM

A linhagem de Glioblastoma Multiforme Humano U-251MG foi mantida em meio de cultura Dulbecco contendo 2% (p/v) L-glutamina e 15% (v/v) de soro fetal bovino, a temperatura de 37°C, umidade relativa mínima de 95%. Para os experimentos, células em crescimento exponencial foram desprendidas dos frascos de cultura usando Tripsina-EDTA.

TRATAMENTO COM CELECOXIBE (CLX) E TEMOZOLAMIDA (TMZ)

Inicialmente, a linhagem celular U-251MG foi tratada com doses seriadas 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. Essas concentrações foram obtidas a partir de um estudo piloto. A seguir os dois fármacos foram testados em combinação. No co-tratamento as células foram tratadas com CLX e TMZ simultaneamente, nas concentrações já citadas, por 72 h. No pré-tratamento foram inicialmente expostas às mesmas doses de CLX por 24 h. Após este período, o CLX foi retirado e adicionado TMZ por 48 h.

AValiação da Citotoxicidade

Vinte e quatro horas antes dos tratamentos com os fármacos, as células foram incubadas em microplacas de 96 poços, em uma densidade de 4 x 10⁴ 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).

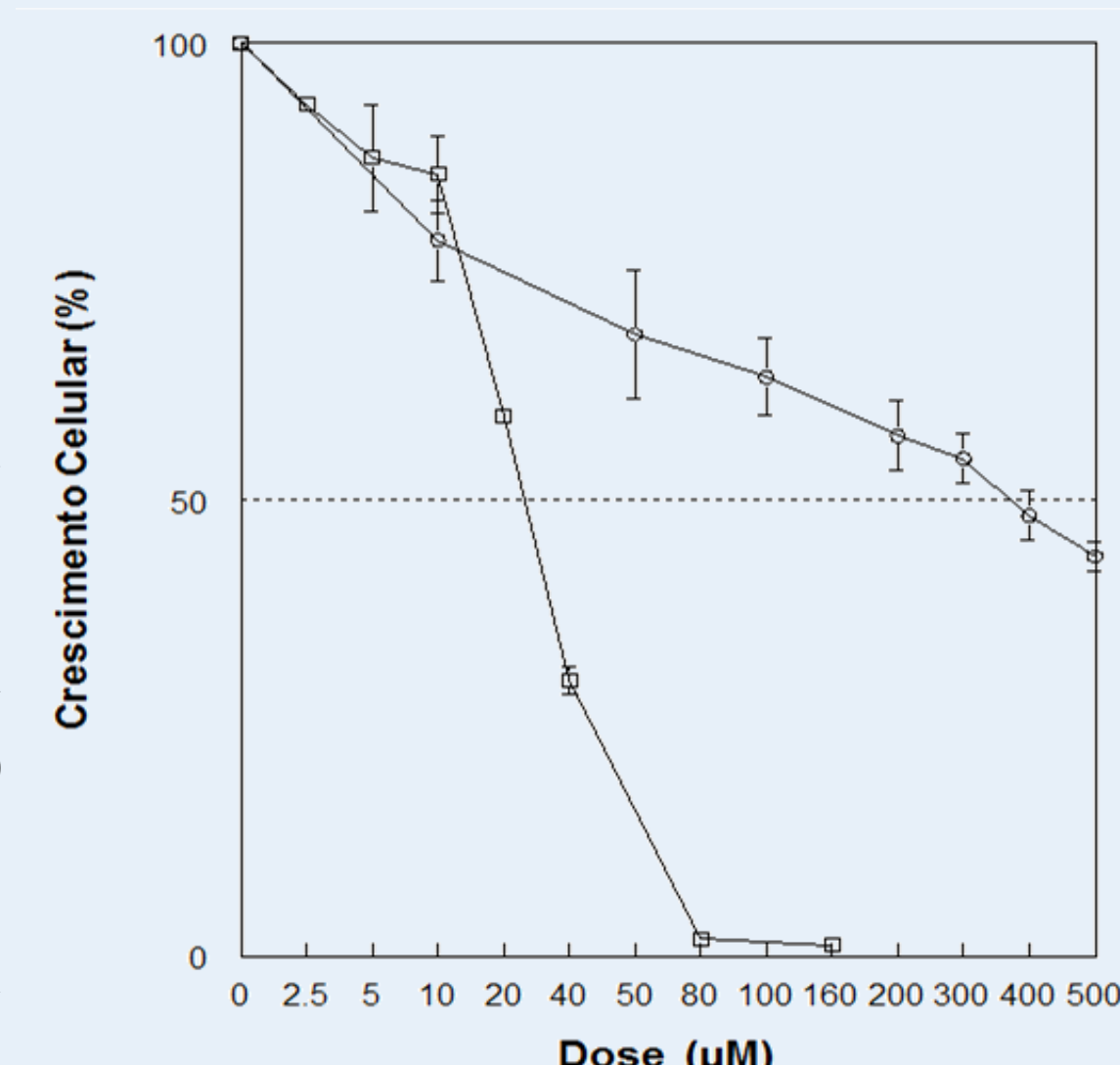
ANÁLISE DA APOPTOSE

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*.

RESULTADOS

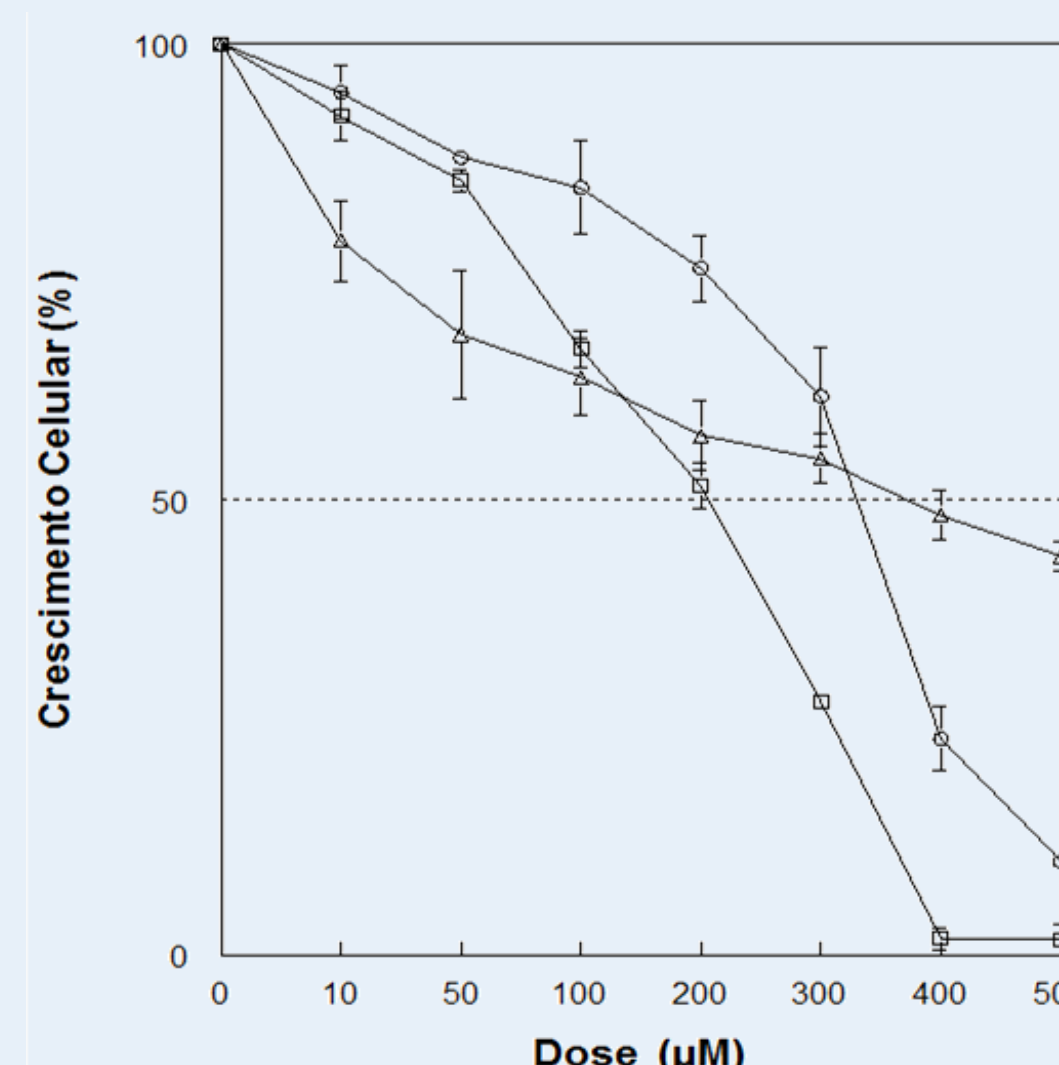
CITOTOXICIDADE COM TMZ E CLX ISOLADOS

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo ensaio colorimétrico de SRB e determinada 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 horas. Observa-se que o CLX apresenta uma dose de IC₅₀ consideravelmente menor (25 µM) quando comparado com a TMZ (IC₅₀ de 373,7 µM), demonstrando que a linhagem celular U251MG é mais sensível ao CLX, quando comparado ao TMZ.



Inibição do crescimento celular na linhagem celular de Glioblastoma Humano U251MG pelo CLX (□) ou TMZ (●) por 72 horas. Os resultados são média ± DP (barras verticais; n ≥ 6).

CITOTOXICIDADE DOS TRATAMENTOS COMBINADOS



Inibição do crescimento celular na linhagem celular de Glioblastoma humano U251MG pela TMZ isolado por 72 horas (Δ); co-tratamento com CLX e TMZ por 72 horas (□) ou Pré-tratamento com CLX por 24 horas seguido da TMZ por 48 horas (○). Os resultados são média ± DP (barras verticais; n ≥ 6).

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. O efeito mais significativo ocorreu quando comparamos os resultados com o co-tratamento.

INDUÇÃO DE APOPTOSE

Ao observarmos a Figura, percebe-se 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.

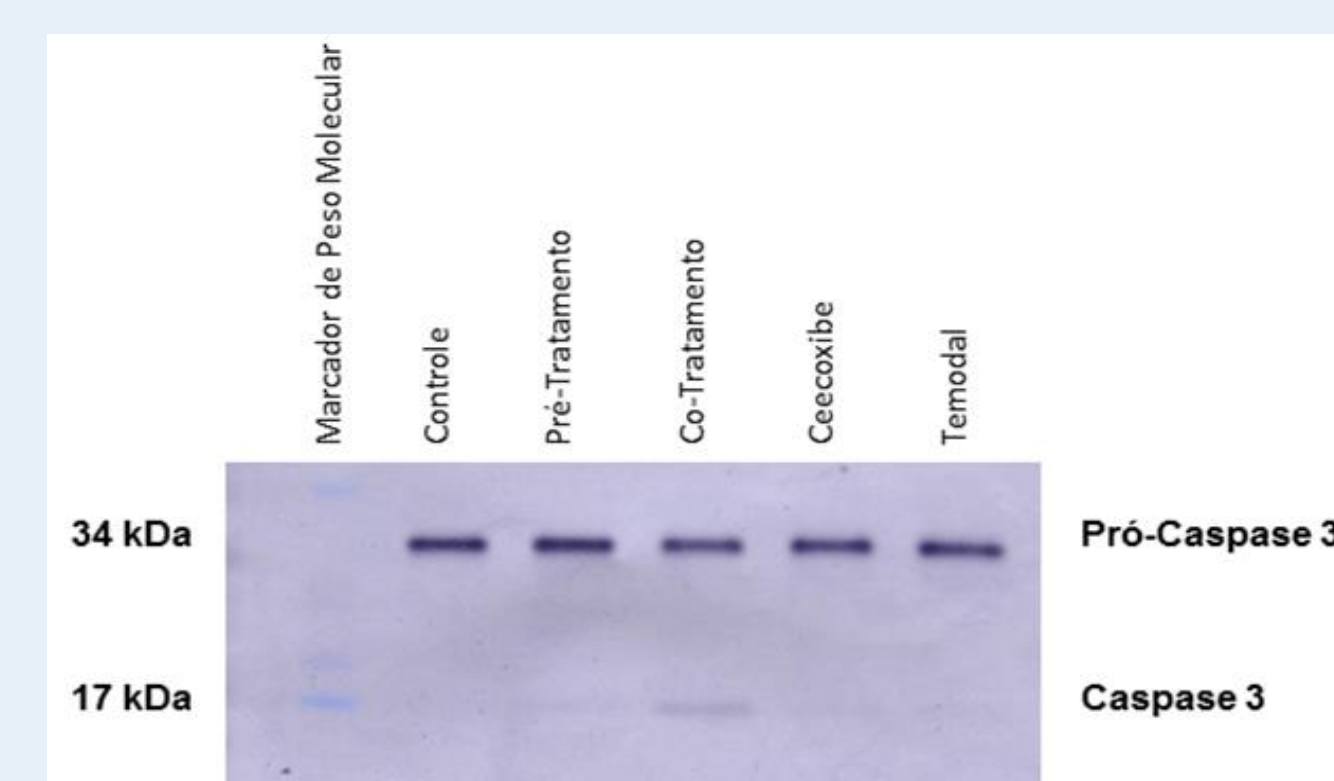


Figura 1. Fotografia representativa de membrana de nitrocelulose para avaliação da expressão de caspase-3 no controle não tratado pré tratamento, co-tratamento, CLX isolado e TMZ isolado.

CONCLUSÃO

Nosso trabalho permitiu concluir:

- Uma maior sensibilidade da linhagem U251MG ao Celecoxibe, necessitando de uma dose muito menor do que a TMZ para atingir o mesmo potencial citotóxico.
- A combinação dos dois agentes, demonstrou uma potencialização na citotoxicidade com o co-tratamento em relação a TMZ isolada e ao pré-tratamento.
- 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.