

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO TEMOZOLOMIDA EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO U87MG

João Antônio Menezes Ribeiro, Felipe Umpierre Conter, Ana Paula de Souza, Rafael Rodrigues Dihl, Ivana Grivicich
Universidade Luterana do Brasil

Introdução

Os Glioblastomas Multiformes (GBM), são tumores caracterizados pela invasão e destruição ao tecido cerebral e resistência a radioterapia e quimioterapia. O uso da Temozolamida (TMZ) como complemento à radioterapia pós-operatória em pacientes com GBM mostra sinais de que a sobrevivência dos pacientes aumenta devido a sua eficácia e baixa toxicidade ao indivíduo.

Objetivos

O Objetivo desse trabalho é investigar, em linhagem celular de glioblastoma multiforme humano U-87MG, o potencial genotóxico e citotóxico do TMZ em linhagem celular de glioblastoma multiforme humano U87MG.

Metodologia

A linhagem U87MG foi mantida em meio de cultura DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino em condições padrão de cultivo. Inicialmente, a linhagem celular U87MG foi tratada com doses seriadas de TMZ por 72 h. 24 h antes dos tratamentos com os fármacos, as células foram incubadas em microplacas de 96 poços, em uma densidade de 4×10^4 células/100 μ L/poço.

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de Sulforodamida B (SRB). A partir deste ensaio determinamos os valores de IC_{50} (quantidade de fármaco necessária para inibir 50% do crescimento celular). Estes foram realizados em triplicata.

A detecção de danos ao DNA foi realizada pelo ensaio cometa. Neste teste foram adicionadas doses de IC_{20} (89 μ M), IC_{50} (355 μ M) e IC_{70} (830 μ M) de TMZ, por 24 h, além do controle não tratado. As células a serem analisadas foram homogeneizadas com gel de agarose de baixo ponto de fusão, distribuídas sobre lâminas de vidro previamente cobertas com gel de agarose de ponto de fusão normal. Após serem mergulhadas em solução de lise foram submetidas a eletroforese em condições alcalinas (pH>13). A seguir foram coradas com brometo de etídio para que os núcleos das células portadoras de quebras de DNA fossem visualizadas sob a forma de um cometa, em microscópio de fluorescência (Olympus BX51). Um total de 100 células foram analisadas por amostra – 50 células contadas para cada repetição. Os núcleos intactos aparecem redondos, enquanto que nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, mostrando uma cauda de fragmentos, semelhante a um cometa. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cauda simples. A classificação dos cometas foi realizada por meio de um software (*Comet Assay IV - Perceptive*) acoplado ao microscópio. O parâmetro utilizado para a avaliação de danos foi a % de DNA na cauda (*tail intensity*).

Resultados

Considera-se que a citotoxicidade do TMZ se deva principalmente à alquilação na posição O^6 da guanina, ocorrendo também alquilação adicional na posição N^7 , levando a célula à morte por dano ao DNA. A indução da morte celular foi observada no ensaio de citotoxicidade, onde se determinou o IC_{50} (355 μ M) (Figura 1).

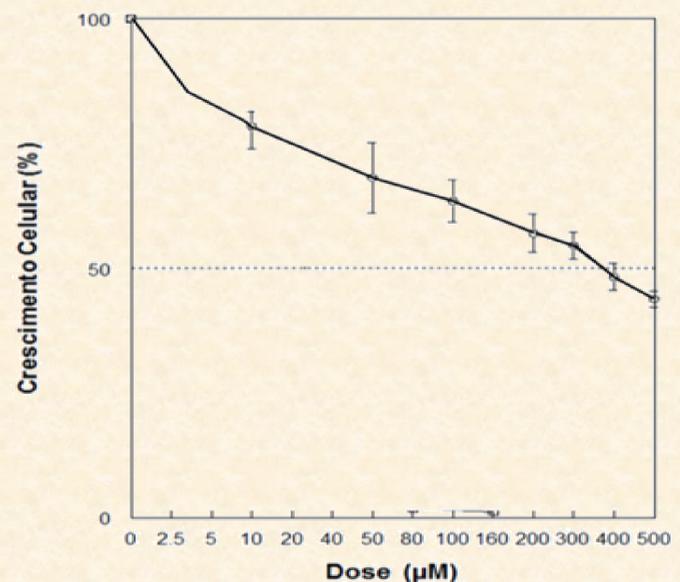


Figura 1: Inibição do crescimento celular na linhagem celular de glioblastoma multiforme humano U-87MG pelo TMZ por 72 h. Os resultados são média DP (barras verticais; n 6).

A fragmentação do DNA pôde ser observada no resultado do ensaio cometa, pela análise da intensidade da cauda (*tail Intensity*), que avalia a quantidade de DNA fragmentado na cauda do cometa (Figura 2). Os resultados mostram um aumento considerável de dano genotóxico com o aumento da dose. Esse Os efeitos mais significativos foram em doses acima de 355 μ M.

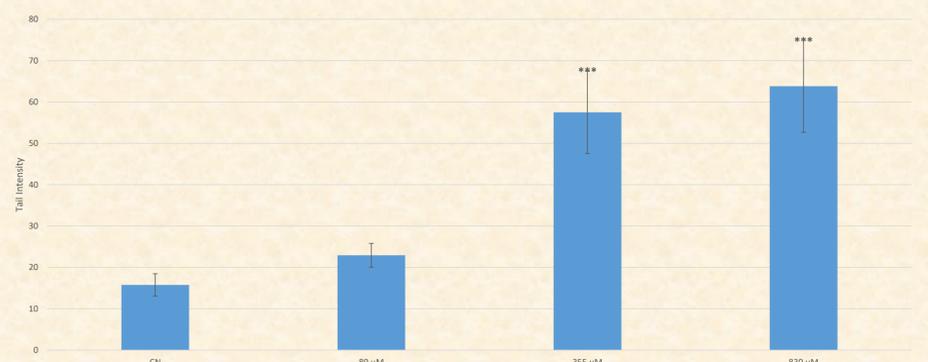


Figura 2: Dano no DNA resultado do tratamento com TMZ nas concentrações de IC_{20} (89 μ M), IC_{50} (355 μ M) e IC_{70} (833 μ M) pelo TI. Resultados expressos em média \pm DP. $P < 0,05^*$, $P < 0,01^{**}$, $P < 0,001^{***}$.

Conclusões parciais

O estudo está em andamento, mas os resultados mostram um potencial genotóxico por parte do tratamento na linhagem U87MG.

Referências bibliográficas

- Aizer AA et al. Adjuvant radiation therapy, local recurrence, and the need for salvage therapy in atypical meningioma. *Neuro Oncol.* 2014;16(11): 1547–53
Hart MG et al. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;(4): 1–18.
Gisela N.C. et al. Effects of temozolomide (TMZ) on the expression and interaction of heat shock proteins (HSPs) and DNA repair proteins in human malignant glioma cells. *Cell Stress.* v. 20(2), p. 253–265. 2015.

Apoio: