



TEMOZOLOMIDA INDUZ CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE NA LINHAGEM CELULAR U87MG

Gabriel Beilfuss Rieth¹

Felipe Umpierre Conter²

Rafael Rodrigues Dihl³

Ivana Grivicich⁴

Resumo

As formas mais comuns e letais de tumores que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC) são os glioblastomas multiformes (GBM), caracterizados pela capacidade invasiva, resistência a tratamentos e destruição do tecido cerebral. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos, agudo e tardio, e os genotóxicos, bem como o envolvimento do sistema de reparo por excisão de bases (BER) da Temozolomida (TMZ) *in vitro*. Para isso, utilizou-se a linhagem celular de GBM U87MG. A avaliação da citotoxicidade aguda foi realizada pelo ensaio da sulforadamina B (SRB) a fim de avaliar o valor de IC₅₀ e a citotoxicidade tardia foi quantificada pelo ensaio de formação de colônias. A genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio cometa versão alcalina (na presença do inibidor de BER, metoxiamina (MTX)), utilizando como parâmetro de danos a porcentagem de DNA na cauda. Os resultados do ensaio SRB mostraram um valor de IC₅₀ de 355 µM. Quanto à formação de colônias, notou-se uma redução na fração de sobrevivência das células com o tratamento a partir do IC₅₀ da TMZ. A genotoxicidade revelou diferença significativa entre o tratamento com TMZ com BER ativo e o tratamento com TMZ na presença do inibidor de BER MTX. Em síntese, o TMZ tem efeito citotóxico agudo e tardio e genotóxico na linhagem de GBM U87MG e este efeito parece estar associado ao mecanismo de reparo por excisão de bases.

Palavras chave: glioblastoma multiforme; temozolomida; citotoxicidade; genotoxicidade

1 Aluno do curso de Medicina – Bolsista FAPERGS – gabrielbeilfuss@ulbra.edu.br

2 Aluno de doutorado do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – lipebtbf@gmail.com

3 Professor do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – rafael.rodrigues@ulbra.br

4 Professora Orientadora do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – grivicich@ulbra.br

INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM), o tumor cerebral mais comum e agressivo em adultos, apresenta capacidade invasiva ao tecido cerebral adjacente, resistência a tratamentos quimioterápicos e radioterápicos e destruição do tecido cerebral (MATEOS-GONZÁLEZ et al., 2014). A Organização Mundial da Saúde os classificou em: 1) glioblastomas IDH-selvagens, ou *de novo*, quando evoluem diretamente de células tronco precursoras ou astrócitos (90% dos casos); 2) glioblastomas IDH-mutados, quando evoluem de GBM de menor grau. A sintomatologia mais frequentemente apresentada por pacientes com diagnósticos de GBM são déficit neurológico, cefaleia, fraqueza motora e convulsão (OSTROM et al., 2014).

No que se refere ao tratamento, a ressecção cirúrgica é a terapia de escolha e deverá ser seguida de tratamento radioterápico. No entanto, o GBM responde com limitada eficácia à radioterapia em função da sua radiorresistência intrínseca (RAHMAN et al., 2010; SAFDIE et al., 2012). Assim, a adição da TMZ como tratamento adjuvante ou como tratamento único, vem mostrando sinais de que a sobrevida dos pacientes aumenta significativamente em virtude de sua eficiência e baixa toxicidade (HART et al., 2008; DRESEMANN, 2010; AIZER et al., 2014). O TMZ é um agente antitumoral alquilante imidazotetracênico, que sofre transformação química rápida na circulação sistêmica em pH fisiológico, formando o composto ativo monometil-triaceno-imidazol-carboxamida (MTIC). Considera-se que a citotoxicidade do MTIC se deva principalmente à alquilação na posição O⁶ da guanina e alquilação adicional na posição N⁷, levando a célula à morte por dano ao DNA (HART et al., 2008; DRESEMANN, 2010). A reparação do DNA é um processo constante e que garante a sobrevivência celular, entre os mecanismos que podem ser acionados, estão o reparo por excisão de bases (BER) (QIANG et al., 2015). O tratamento do GBM por TMZ, que resulta na metilação da porção N⁷ da guanina, o qual pode ser reparado pela ação do BER. Para compreender o papel exercido pelo mecanismo de reparo por excisão de bases, utilizamos o inibidor seletivo de BER, a Metoxiamina (MTX) (GOELLNER et al., 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico agudo e tardio, bem como a genotoxicidade induzida pela TMZ e o papel do reparo por excisão de bases na linhagem celular U87MG.

METODOLOGIA

A linhagem de glioblastoma multiforme humano U-87MG foi mantida em meio de cultivo DMEM (Gibco BRL, NY, USA) contendo 2% (p/v) L-glutamina e 15% (v/v) de soro

fetal bovino (FCS; Cultilab, SP, Brasil) em condições adequadas de cultivo. As culturas foram tratadas com doses da TMZ (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M) obtidas a partir de um estudo piloto, por 24 h.

A citotoxicidade aguda foi avaliada pelo ensaio de SRB (SKEHAN et al., 1990), que inclui fixação das células e coloração. Após a coloração, o SRB foi acessado colorimetricamente em leitor de microplacas (Multiskan, Uniscience) em comprimento de onda de 540 nm. O SRB que se liga as células é proporcional à densidade celular e determinado pelas absorvâncias obtidas. A partir deste ensaio determinamos os valores de IC₅₀ (quantidade de fármaco necessária para inibir 50% do crescimento celular), que foram utilizados nos experimentos seguintes.

A citotoxicidade tardia foi avaliada pelo ensaio de formação de colônias, após os seguintes tratamentos: TMZ IC₂₀ (88,75 μ M), TMZ IC₅₀ (355 μ M), TMZ IC₇₀ (830 μ M) por 24 h. Após esse período as células foram incubadas por 14 dias em meio de cultura completo. As colônias foram coradas com violeta cristal 0,1% por 30 min e quantificadas utilizando um microscópio invertido. Os resultados foram demonstrados como fração de sobrevivência (FS) (FRANKEN, 2005).

A avaliação da genotoxicidade, pelo ensaio cometa alcalino (TICE et al., 2000), foi realizada após 24 h dos seguintes tratamentos TMZ IC₅₀, TMZ IC₅₀ + MTX (20 mM) e controle positivo (H₂O₂). O dano ao DNA foi avaliado em 4 tempos após o final do tratamento (0 h, 2 h, 12 h e 24 h). Cada lâmina foi corada com brometo de etídio e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51). 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 porcentagem de DNA na cauda (*tail intensity*).

As análises estatísticas foram realizadas com a análise de variância (*one-way ANOVA*) e teste post hoc de Dunnett's ou teste t de *Student*, conforme a situação apresentada. Todos os valores de p apresentados são de duas vias e os valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da citotoxicidade aguda revelou, após 24 h de tratamento, um IC₅₀ de 355 μ M. Esta concentração foi utilizada nos outros estudos. A seguir, investigamos a citotoxicidade tardia do TMZ na linhagem celular U87MG, analisando a formação de colônias celulares após exposição do quimioterápico. A fração de células sobreviventes

tratadas com TMZ IC₂₀ e TMZ IC₅₀ foi, respectivamente, 45% e 20%. Não houve células sobreviventes com o tratamento por TMZ IC₇₀. AKBARNEJAD et al. (2017) reportaram em seu estudo com duas linhagens de glioblastomas (U87MG e T98G), uma relação dose dependente e tempo de exposição dependente do TMZ. Foi demonstrado que a linhagem U87MG é mais sensível a ação do TMZ, quando comparada a T98G. Mais ainda, após 72 h de exposição ao TMZ em concentrações entre 200 e 400 µM, linhagem celular U87MG mostrou uma redução na viabilidade celular próxima a 50% (AKBARNEJAD et al., 2017). Esse resultado é coerente com nosso estudo, onde o valor de IC₅₀ foi 355 µM. Em nosso estudo, observamos que há uma diferença estatisticamente significativa entre as frações afetadas nos tratamentos em relação ao controle, o que permite afirmar que a exposição ao TMZ, na linhagem de GBM U87MG, possui efeito tardio relativo à sua concentração. Na concentração de IC₇₀ não houve formação de colônias, devido à alta toxicidade e letalidade do TMZ em relação a linhagem U87MG.

A quantidade de DNA presente na cauda do cometa (*tail intensity*) denota que houve diferença significativa entre o tratamento com TMZ (BER ativo) e TMZ (BER inativo; na presença de MTX). Ao avaliarmos o tratamento com TMZ (BER ativo), até 2 h após o tratamento existe diferença em relação ao controle. No entanto, essa diferença desaparece após 12 h, indicando que mecanismo de reparo está ativo na linhagem celular. Esse comportamento não foi observado no tratamento com TMZ (BER inibido por MTX), onde se manteve diferente do controle negativo até o período máximo de 24 h. Quando avaliamos a relação dos tratamentos entre si, em função do tempo, observamos que apenas no tratamento com TMZ (BER ativo) houve diferença significativa após 2 h, indicando que há algum mecanismo de reparo atuante após esse período. Ao avaliarmos o tratamento de TMZ (BER inibido), não há diferença significativa entre os tempos avaliados. Isso permite afirmar que a inibição de mecanismo de reparo por excisão de bases está atuante, impedindo a reparação do dano causado pela metilação de DNA pelo TMZ.

O efeito do tratamento com TMZ em gliomas em função do tempo foi demonstrado no estudo de MONTALDI et al (2015) em que após o período de 0 h de recuperação celular, não havia diferença significativa entre os resultados de *tail intensity* para o controle negativo e tratamento com TMZ. Como resultado, a linhagem celular não demonstrou indícios de reparo após período de recuperação. Em nosso estudo, testamos a inativação da via de reparo por excisão de bases pela ação do fármaco MTZ. O mecanismo de reparo por BER é desencadeado a partir da metilação da guanina, pelo TMZ, formando a N⁷- metilguanina (N⁷-MG). A alteração na progressão do ciclo celular, em razão de alteração na regulação de

ciclinas pelo *TP53*, foi proposta no estudo de MONTALDI et al (2015), para explicar a redução na formação de colônias celulares em linhagem de GBM U87MG exposta ao tratamento com TMZ. Considerando-se que o ensaio de formação de colônias celular ocorre após o ciclo de tratamento com TMZ por 24 h, espera-se que apenas as células menos sensíveis ao tratamento formem colônias. As colônias formadas nesse ensaio representam a fração sobrevivente que desenvolveu algum tipo de resistência ao quimioterápico.

CONCLUSÕES

Podemos concluir que o tratamento com TMZ exerceu um efeito citotóxico agudo e tardio, dose dependente sobre a linhagem de GBM U87MG. A genotoxicidade comprovou que a metilação realizada pela TMZ desencadeia o mecanismo de reparo por excisão de bases.

REFERÊNCIAS

- AIZER, A.A., et al. Adjuvant radiation therapy, local recurrence, and the need for salvage therapy in atypical meningioma. **Neuro-Oncology**, v. 16, p. 1547-1553, 2014.
- AKBARNEJAD,Z., et al. Cytotoxicity of temozolomide on human glioblastoma cells is enhanced by the concomitant exposure to an extremely low-frequency electromagnetic field (100Hz, 100G). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 254-264, 2017.
- DRESEMANN, G. Temozolomide in malignant glioma. **OncoTargets and Therapy**, v. 3, p. 139-146, 2010.
- FRANKEN, N.A., et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315-2319, 2006.
- HART, M.G., et al. Temozolomide for high grade glioma. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, p. 1-18, 2008.
- GOELLNER, E.M., et al. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD⁺ biosynthesis and base excision repair. **Cancer Research**, v. 71, p. 2308-2317, 2011.
- MATEOS-GONZÁLEZ, M.E., et al. Response to everolimus in patients with giant cell astrocytoma associated to tuberous sclerosis complex. **Revista de Neurología**, v. 59, p. 497-502, 2014.
- MONTALDI, A.P.; GODOY, P.R.; SAKAMOTO-HOJO, E.T. APE1/REF-1 down-regulation enhances the cytotoxic effects of temozolomide in a resistant glioblastoma cell line. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 793, p. 19-29, 2015.
- OSTROM, Q.T., et al. The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. **Neuro-Oncology**, v. 16, p. 896-913, 2014.

QIANG, L., et al. Autophagy positively regulates DNA damage recognition by nucleotide excision repair. **Autophagy**, v. 12, p. 357-368, 2016.

RAHMAN, R., et al. Antiangiogenic therapy and mechanisms of tumor resistance in malignant glioma. **Journal of Oncology**, v. 2010, p. 251231, 2010.

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.

SAFDIE, F., et al. Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy. **PLoS One**, v. 7, p. 44603, 2012.

TICE, R.R., et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.