

HEXAHIDROXITRIFENILENO NÃO MODULA O PROCESSO DE SENESCÊNCIA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

OTÁVIO MARTINS CRUZ¹; CAROLINA PIRES SIMÕES RIBEIRO¹; JOSÉ LUCAS MALOSTI TEODORO RODRIGUES¹; HERBERT WINNISCHOFER²; GLAUCIA REGINA MARTINEZ¹; SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER¹.

¹Universidade Federal do Paraná – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
(otaviomartinscruz@yahoo.com.br; sheilambw@ufpr.br)

² Universidade Federal do Paraná – Departamento de Química

1. INTRODUÇÃO

Os gliomas são neoplasias do sistema nervoso central (SNC) que se originam nas células da glia (ZONG, 2012). São amplamente heterogêneos tanto histológica quanto clinicamente e são classificados em uma escala de I a IV de acordo com seu grau de malignidade (ZONG, 2012; FILLIPI-CHIELA et al., 2013).

As terapias atuais para o tratamento de gliomas, como a quimioterapia com Temozolomida (TMZ), a radioterapia e os procedimentos cirúrgicos, mostram-se ineficientes na maioria dos casos, fato corroborado pelos altos índices de mortalidade por esta patologia (BLEEKER et al., 2012; VILLALONGA-PLANELLIS et al., 2011; HUI et al., 2013). Nos Estados Unidos, a *American Cancer Society* (ACS) registrou no ano de 2012 a ocorrência de 23.380 casos de câncer no sistema nervoso central (SNC) e deste total, 14.320 pacientes vieram a óbito em decorrência de tumores malignos do cérebro (ACS, 2014). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima para os anos de 2012/2013 a ocorrência de 9.270 novos casos de câncer no SNC (INCA, 2012).

Uma das estratégias utilizadas visando diminuir a alta mortalidade por esta doença é a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na resistência das células de glioma à terapêutica atual. Alguns estudos apontam o processo de senescência celular como um mecanismo dual, ora capaz de promover o tumor ora capaz de suprimir o desenvolvimento tumoral. O melhor entendimento da biologia tumoral dos gliomas pode vir a subsidiar a compreensão da elevada agressividade desse tipo de tumor, assim como a investigação de novas estratégias terapêuticas. Grande esforço tem sido direcionado na concepção de novos agentes antitumorais e os compostos polifenólicos vêm sendo apontados como candidatos terapêuticos.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho é avaliar o papel do derivado de catecol hexahidroxitrifênileno (HTF) no processo de senescência em células de glioblastoma humano.

2. METODOLOGIA

2.1 Meio de Cultura, Linhagem Celular e Condições de Cultivo

O meio de cultura utilizado foi DMEM alta glicose (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 50µg/mL do antibiótico gentamicina (Sigma Aldrich). A linhagem de glioma estudada (U87MG) foi gentilmente cedida pela Professora Mari Cleide Sogayar (Instituto de Química – USP). Esta linhagem refere-se ao glioblastoma multiforme (grau IV na escala de classificação do gliomas). *In vitro*, as células U87MG desenvolvem-se como culturas aderentes cultivadas em garrafas de poliestireno estéreis (Techno Plastic Products –TPP). Estas culturas foram mantidas em incubadora sob atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. A subcultura foi realizada de acordo com a confluência das células, utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprendê-las do substrato plástico.

2.2 Avaliação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Foram plaqueadas $1,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços e estas foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 24h para a adesão das células. Após este período foi realizado o tratamento com o HTF nas concentrações de 10 e 25 µmol/L nos tempos de 12, 24 e 48 horas.

2.3 Avaliação da Senescência Celular

Para análise qualitativa da ocorrência de senescência celular em células tratadas com HTF foi utilizado o kit Senescence β- galactosidase staining (Cell Signaling Technology). Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células por poço em placas de 6 poços e as células foram incubadas durante 24h para adesão. Após a adesão, foi adicionado às placas o meio contendo HTF nas concentrações de 10 e 25µmol/L nos tempos de 12, 24 e 48h. Após o tratamento, foi realizado o ensaio para a detecção da senescência celular, seguindo as recomendações do fabricante do kit utilizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Viabilidade Celular

Observou-se que no tempo de 12h o HTF não diminuiu a viabilidade celular em nenhuma das doses avaliadas. No tempo de 24h, observou-se que a dose de 25µM reduz em 22% a viabilidade das células U87MG, enquanto no tempo de 48h na dose de 10µM a redução foi de 37% e de 57% na dose de 25µM (Figura.1).

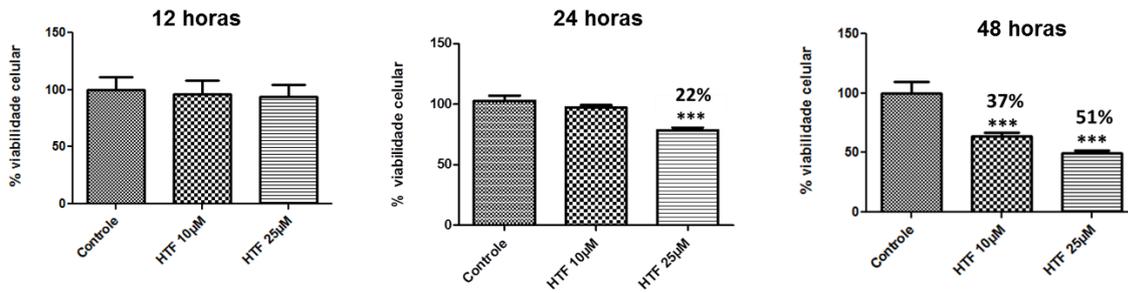


FIGURA 1 - EFEITO DO HEXAHIDROXITRIFENILENO (HTF) NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO DA LINHAGENS U87MG NOS TEMPOS DE 12, 24 E 48 HORAS.

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Gráfico da porcentagem de células U87MG viáveis em relação ao controle, após tratamento com 10 e 25 µM de HTF, com exposição de 12,24 e 48 horas. Os controles (células em que somente o veículo foi administrado – DMSO 0,1%) representam 100% de viabilidade. Cada coluna dos gráficos representa a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes 12h ($p=0,92$), 24h ($p<0,0001$) e 48h ($p<0,0001$).

3.2 Avaliação da Senescência Celular

A análise microscópica após a coloração das células U87MG revelou que nenhuma das doses de HTF em nenhum dos tempos avaliados desenvolve coloração azul característica de células senescentes (Figura. 2). Tendo em vista este resultado e que a senescência induzida por terapia tem sido vislumbrada como tratamento citostático em alguns tipos de tumores, estes testes serão expandidos para outras linhagens de glioma com diferentes estágios de progressão tumoral, visando comprovar os dados preliminares e estabelecer o mecanismo de ação do HTF em modelo de glioma humano.

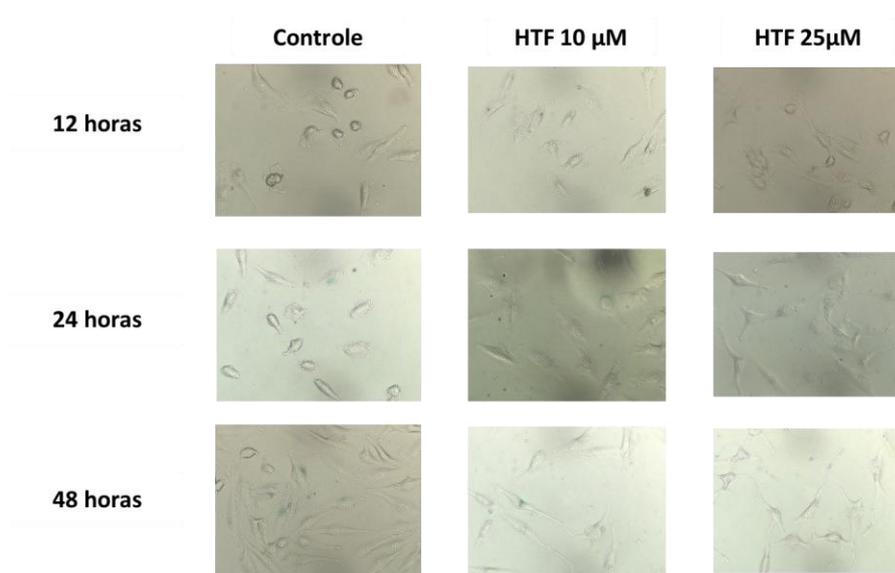


FIGURA. 2 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DO ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADO A β-GALACTOSIDASE APÓS TRATAMENTO COM HEXAHIDROXITRIFENILENO.

FONTE: O autor (2014).

NOTA: Micrografias representativas (aumento de 200x) de células U87MG após o tratamento com HTF (12, 24 e 48h) submetidas ao ensaio de atividade de β-gal associada à senescência.

4. CONCLUSÕES

A compreensão dos mecanismos intracelulares envolvidos na resistência dos gliomas a atual terapêutica torna imperativo a busca por novas estratégias de tratamento. Nossos dados iniciais mostram que o HTF, apesar de exibir elevada toxicidade nas doses de 10 e 25 μM no tempo de 48h, não modula o processo de senescência nas células U87MG. A busca por novos mecanismos que estejam envolvidos na patogênese dos gliomas permanece uma constante. Assim, esse trabalho será conduzido a fim de elucidar o papel do HTF em modular senescência, assim como atuar em distintos processos celulares como a autofagia e a apoptose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS. **American Cancer Society**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em 15/07/2014.

BLEEKER, F.E. et al. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **Journal of Neurooncology**, v.108, p.11-27, 2012.

FILIPPI-CHIELA, E.C. et al. Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. **BMC Cancer**, v.13, p.1471-2407, 2013.

HUI, W. et al. MicroRNA-195 Inhibits the Proliferation of Human Glioma Cells by Directly Targeting Cyclin D1 and Cyclin E1. **Plos One**, v.8, n.1, p.1-10, 2013.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 11/07/2014.

ZONG, H. et al. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. **Expert Review in Molecular Diagnostic**, v.13, p. 383-394, 2012.

VILLALONGA-PLANELLIS, R. Activation of p53 by Nutlin-3a Induces Apoptosis and Cellular Senescence in Human Glioblastoma Multiforme. **Plos One**, v.6, n.4, 2011.