

INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TOLL-LIKE 4 NA PROLIFERAÇÃO E QUIMIORESISTÊNCIA EM GLIOMA C6

JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA¹; TAÍSE ROSA DE CARVALHO²; ELITA FERREIRA²; FÁTIMA T.A. BEIRA²; ROSÉLIA M. SPANEVELLO²; ELIZANDRA BRAGANHOL³

¹³Centro de Ciências Químicas, Farmacêutica e de Alimentos - CCQFA - UFPEL –
julianahazambuja@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – *taisecarvalho_@hotmail.com*

³Universidade Federal de Pelotas – *elizbraganhol@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

Gliomas são tumores primários que surgem no sistema nervoso central (SNC) e que compartilham semelhanças morfológicas e expressão de proteínas relacionadas a células gliais, tais como astrócitos, oligodendrócitos e seus precursores. O glioblastoma multiforme constitui a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral e representa cerca de 50% de todas as neoplasias do SNC (HOLLAND, 2001). Esse tumor é caracterizado por uma população heterogênea de células geneticamente instáveis, grande capacidade de infiltração, angiogênese e resistência à quimioterapia (WEN et al 2008).

A cirurgia representa o tratamento de primeira escolha, seguida de radio e/ou quimioterapia utilizando como fármaco um agente alquilante de DNA, a temozolomida (TMZ) (HUSE E HOLLAND, 2010). A sobrevida relativa em cinco anos para pacientes com câncer no SNC é próxima de 20%, ou seja, a maioria dos pacientes não chega a sobreviver 5 anos após o diagnóstico (INCA, 2013). Os pacientes com GBM apresentam uma sobrevida média de 12-14 meses após o diagnóstico (STUPP et al 2009). O prognóstico continua muito pobre porque as células neoplásicas invadem o parênquima cerebral e naturalmente desenvolvem resistência à maioria dos fármacos citotóxicos e radioterapia (LEFRANC, 2005). Clinicamente, a resistência adquirida a TMZ é um problema significativo, com mais de 90% dos gliomas recorrentes mostrando nenhuma resposta ao TMZ (Oliva, 2010)

Receptores Toll-like (TLR) são uma família de receptores que medeiam o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (JANEWAY, 2002). O TLR-4 reconhece o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e desencadeia uma série de eventos que levam a um aumento da expressão de genes pró-inflamatórios (AKIRA et al 2001). Estudos indicam que o TLR-4 desempenha função importante na atividade proliferativa dos gliomas (SARRAZY et al 2011). Além disso, o aumento na expressão de TLRs tem sido relacionada ao aumento da malignidade bem como a resistência a radio/quimioterapia (CHEN et al, 2008).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o envolvimento do TLR4 na proliferação e quimioresistência em linhagem de glioma C6.

2. METODOLOGIA

2.1 Culturas de células

A linhagem de GBM de rato (C6) (ATCC) foi cultivada em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e mantida a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO₂.

2.2 Tratamento das culturas

As células de glioma C6 ou C6 resistentes ao TMZ foram semeadas em placas de 24 poços em meio DMEM suplementado com 5% de SFB. Após 24 h de incubação as células foram submetidas a um protocolo de redução de SFB a 0,5% com o objetivo de manutenção das células em fase G0 do ciclo celular. Decorridas 24 h, foi efetuado o tratamento com LPS (1, 10 e 100 ng/mL) com duração de 48 h sendo que as células tratadas somente com DMEM foram consideradas controle.

2.3 Contagem celular

Após o término do tratamento, as células foram soltas com 100 µL de tripsina por poço. A placa retornou para a incubadora por 5 minutos e após esse período foi adicionado 200 µL de meio DMEM 5% SFB para neutralizar o efeito da tripsina. Assim que o meio foi adicionado o volume final de 300 µL foi transferido para um tubo *ependorf* e homogeneizado e as células foram colocadas em câmara de Neubauer para contagem. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey e os valores foram considerados significativamente diferentes do controle para um $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que quando células de glioma C6 foram tratadas com LPS nas concentrações de 1 e 10 ng/ml ocorreu um aumento significativo no número de células em 36% e 48% respectivamente, quando comparado ao controle. Entretanto quando as células foram tratadas com 100 ng/mL não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle (Figura 1). Esses achados sugerem que o tratamento com LPS e a consequente estimulação do TLR4 aumenta a proliferação de linhagem de glioma, porém a resposta não é dose dependente.

Quando as células de glioma quimioresistentes foram expostas ao LPS 100 ng/mL ocorreu uma diminuição da proliferação e uma redução de 51% no número de células em relação ao controle, enquanto que nas concentrações de 1 e 10 ng/mL não foram encontradas diferenças significativas (Figura 1).

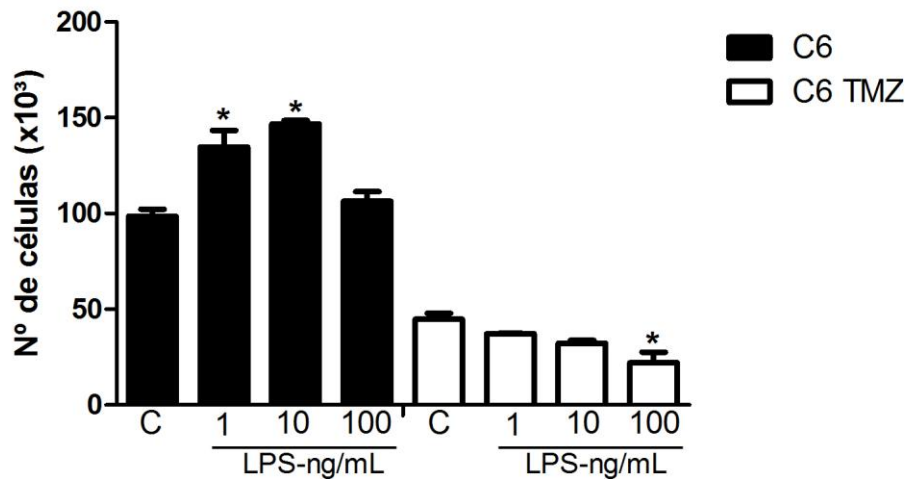


Figura 1: Efeito de LPS 1, 10 e 100 ng/mL em cultura de GBM de rato (C6; barras escuras) e de GBM resistente ao TMZ (C6TMZ; barras claras) após 48 h de tratamento. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey. *Diferença significativa quando comparado ao controle para um $P \leq 0,05$.

4. CONCLUSÕES

A estimulação dos receptores TLR-4 levaram a um aumento na proliferação e número de células de gliomas, mostrando um possível envolvimento desse receptor com a progressão tumoral. Porém, sua resposta se encontra alterada em células resistentes ao TMZ, sugerindo um envolvimento na quimioresistência. Mais estudos ainda são necessários para identificar os mecanismos envolvidos associados a esse efeito.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN R, ALVERO AB, SILASI DA, STEFFENSEN KD, MOR G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene*, v. 27(2), p. 225-33, 2008.

JANEWAY CA, JR., MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197–216.

AKIRA S, TAKEDA K, KAISHO T. Toll-like receptors critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675–80.

SARRAZY V, VEDRENNE N, BILLET F, BORDEAU N, LEPREUX S, VITAL A, JAUBERTEAU M, DESMOULIÈRE A. TLR4 signal transduction pathways neutralize the effect of Fas signals on glioblastoma cell proliferation and migration. *Cancer Letters*. 311 195–202, 2011.

HOLLAND, E.C. Progenitor cells and glioma formation. *Curr Opin Neurol*, v.14, n6, p.683-8. 2001.

HUSE, T.J.; HOLLAND, E.C. Genetically Engineered Mouse Models of Brain Cancer and the Promise of Preclinical Testing. *Brain Pathol*, v.19, n.1, p. 132-143. 2009.

WEN, P.Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 2008, 359, 492–507.

STUPP, R.; HEGI, M.E.; MASON, W.P.; VAN DEN BENT, M.J.; TAPHOORN, M.J.; JANZER, R.C.; LUDWIN, S.K.; ALLGEIER, A.; FISHER, B.; BELANGER, K.; *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide *versus* radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-Year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **2009**, 10,459–466.
Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014 : incidência de câncer no Brasil. 2013.

LEFRANC F, BROTCHI J, KISS R: Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol* 2005, **23**:2411-2422.

OLIVA CR, NOZELL SE, DIERS A, MCCLUGAGE SG, 3RD, SARKARIA JN, MARKERT JM, DARLEY-USMAR VM, BAILEY SM, GILLESPIE GY, LANDAR A, GRIGUER CE. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2010;285:39759–39767.