

Introdução:

Glioblastoma (GMB) é o subtipo mais comum de tumor primário do Sistema Nervoso Central e é considerado a forma mais agressiva de glioma. O prognóstico de sobrevivência médio de pacientes com GMB é de aproximadamente 14 meses, resultado do alto grau de invasividade e resistência a radio e quimioterapia das células tumorais.

O quimioterápico de escolha na clínica para tratamento de GMB é a temozolomida (TMZ), um agente alquilante causador de pareamentos errôneos de base, assim, é indutor de morte celular por acúmulo de danos no DNA. No entanto, as células tumorais apresentam mecanismos de resistência ao fármaco, o que culmina na manutenção de subpopulações de células resistentes. Portanto, o objetivo do trabalho é avaliar as alterações induzidas por TMZ, nos principais mecanismos celulares, de forma aguda, e investigar seus efeitos a longo prazo em linhagens de glioma.

Metodologia e Resultados:

Curva de dose de TMZ das linhagens de Glioma

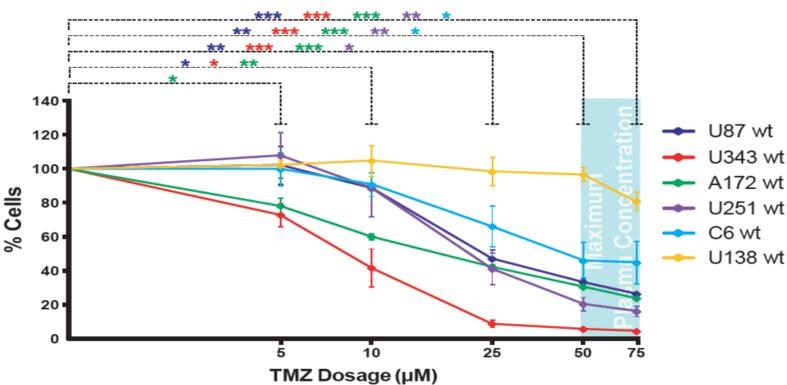


Figura 2 – TMZ reduz a viabilidade celular de gliomas de maneira dose-dependente. Por meio da curva de dose, observa-se que as linhagens celulares U87, U343, A172 e U251 apresentaram alta sensibilidade aguda ao tratamento com TMZ, de forma dose dependente, enquanto as demais (C6 e U138) apresentaram perfil resistente. A linha preta pontilhada representa a resposta média das linhagens de glioma ao tratamento com TMZ. A significância estatística é representada pelos asteriscos coloridos de acordo com a representação de cor de cada linhagem de glioma. T-test ($*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$) (n=3).

Ensaio Anexina V/PI

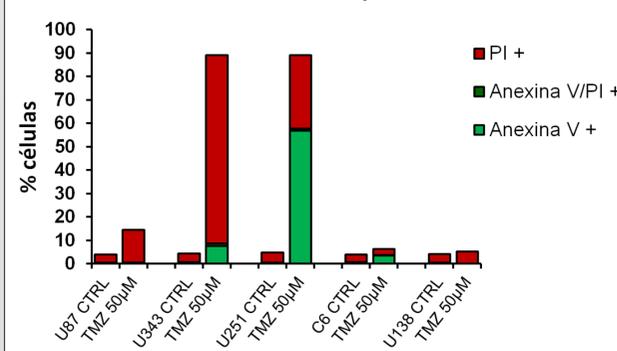
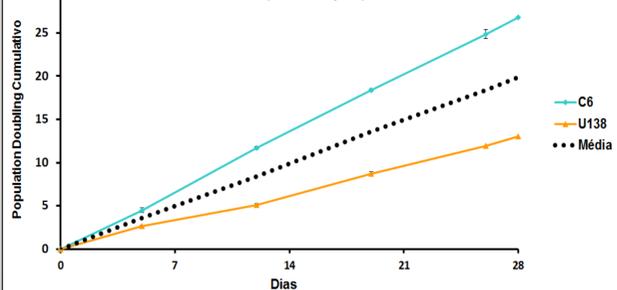


Figura 3 – TMZ induz morte celular de maneira distinta para cada linhagem. O número de eventos estimados como células viáveis foi considerado 100%. O gráfico ilustra apenas as células positivamente marcadas. (n=2)

Proliferação Celular de GLIOMAS resistentes (TMZ50µM)



Proliferação Celular de GLIOMAS sensíveis (TMZ50µM)

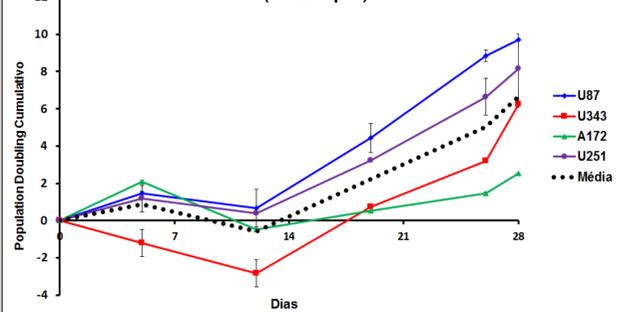


Figura 7 – Manutenção da capacidade proliferativa das linhagens de glioma pós-tratamento com TMZ 50µM. Os quadros superior e inferior mostram o perfil de proliferação das linhagens naturalmente resistentes e sensíveis à TMZ, respectivamente. O perfil proliferativo foi analisado através do ensaio de Population Doubling Cumulativo durante 28 dias: vê-se uma resposta inicial bastante satisfatória, até o 12º dia, para as linhagens sensíveis, seguido de um crescimento exponencial da população celular. O perfil proliferativo de células resistentes não foi alterado pós-tratamento.

Desenho Experimental



Figura 1 – Desenho Experimental. Seis linhagens de glioma (U87, U343, A172, U251, C6 e U138) foram tratadas com TMZ nas doses 5, 10, 25, 50 e 75µM, por 5 dias. Ensaio de ciclo celular, de viabilidade celular, de morte celular, de autofagia, senescência, formação de colônias e proliferação a longo prazo foram realizados.

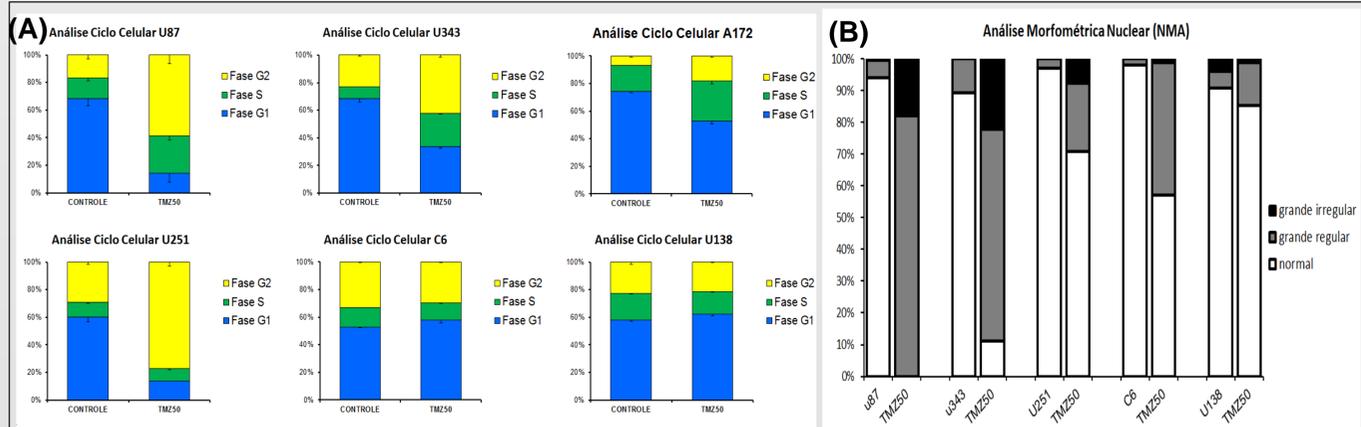
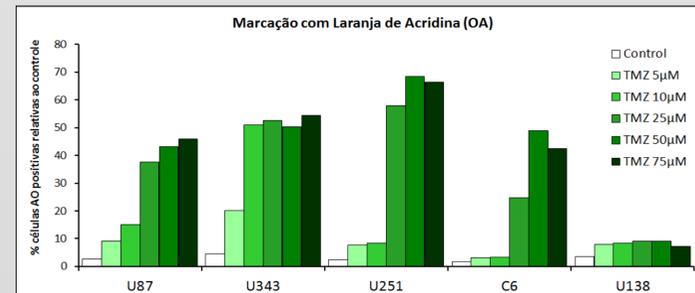


Figura 4 – TMZ induz parada no ciclo celular e senescência em linhagens de glioma. Foram escolhidas duas doses de TMZ para cada linhagem de acordo com seu efeito resultante. (A) No ensaio de ciclo celular observou-se efeitos de acúmulo no ciclo, principalmente em G2, para todas as linhagens sensíveis e nenhum efeito nas linhagens resistentes (n=3). (B) No ensaio de análise morfológica nuclear (NMA), viu-se um aumento dose-dependente da área nuclear em algumas linhagens sensíveis a TMZ, 15 dias após o tratamento, e nenhum efeito foi observado nas linhagens resistentes. O número total de núcleos analisados foi considerado 100%. (n=2)

Marcação com Laranja de Acridina (OA)



Marcação com Laranja de Acridina

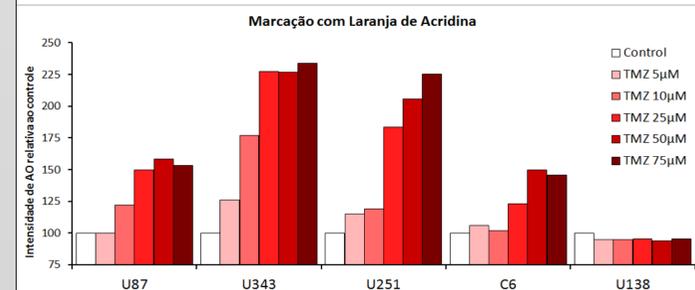


Figura 5 – TMZ induz aumento na autofagia em número e intensidade de maneira dose-dependente para quase todas as linhagens de glioma. Observou-se um aumento expressivo na porcentagem e intensidade da marcação, de maneira dose-dependente, em todas as linhagens, exceto U138. O quadro superior representa a % relativa de células positivamente marcadas. O quadro inferior representa a intensidade relativa da marcação com AO, no qual o controle foi considerado 100%. Os gráficos representam a média de 3 experimentos independentes.

Ensaio de Formação de Colônias

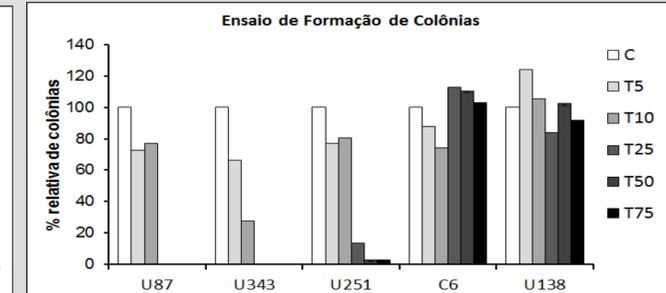


Figura 6 – TMZ reduz a formação de colônias, de maneira dose-dependente, em quase todas as linhagens de glioma. Células em alta confluência foram semeadas e, após os 5 dias de tratamento com TMZ nas doses entre 5 e 75µM, foram contadas em citômetro de fluxo. 100 células tratadas foram semeadas para realização do ensaio de formação de colônias. O número de colônias do controle foi considerado 100%. O gráfico representa a média de 2 experimentos independentes.

Conclusão e Perspectivas:

O Tratamento de gliomas com TMZ na dose plasmática (Fig. 2) elimina uma grande parcela da população, em todas as linhagens sensíveis, por uma série de mecanismos distintos, como se pode ver nas Fig. 3, 4 e 5. Entretanto, TMZ, fármaco de escolha clínica para tratamento de gliomas, mostrou uma possível eficácia terapêutica somente em algumas linhagens e apenas de forma aguda. O tratamento de um número expressivo de células - ao contrário dos dados observados no ensaio clonogênico (Fig. 6)- com a dose plasmática de TMZ (50µM) e avaliação a longo prazo, revelaram a reaquisição da capacidade proliferativa em todas as linhagens estudadas. Assim, considerando os efeitos do quimioterápico na clínica, é possível que TMZ selecione subpopulações de células resistentes que tornam-se responsáveis pelo reestabelecimento da massa tumoral (Fig. 7).

Com base nos resultados apresentados, é necessário a busca de novas estratégias terapêuticas e, terapias com fármacos adjuvantes pode representar uma possibilidade de tratamento a ser estudada. Ademais, o uso de ensaios crônicos de investigação dos efeitos antitumorais de novas propostas de tratamento parece ser mais fidedigno ao que ocorre na clínica, tornando-se uma opção mais adequada para este tipo de estudo.