

O COMPOSTO 11A-N-TOSIL-5-DEOXI-PTEROCARPANO, LQB-223, MODULA O MICRORNA-7 E A VIA DAS MAP KINASES ERK1/ERK2 EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA COM DIFERENTES PERFIS DE RADIORESISTÊNCIA

Gustavo Henrique Cardoso Guimarães (DO)^{1,2}, Paula Sabbo Bernardo^{1,2}, Paulo R.R. Costa³, Camila D. Buarque⁴, Raquel Ciuvalschi Maia¹

1. Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA).

2. Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Oncologia, INCA. 3. Laboratório de Química Bio-Orgânica, Instituto de Pesquisa em Produtos Naturais (IPPN), UFRJ.

4. Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica (PUC)

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O Glioblastoma (GB) é um astrocitoma altamente agressivo, de grau IV, cujos pacientes apresentam média de sobrevida global de 12 meses. O tratamento padrão baseia-se em uma combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia com temozolamida. O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) exerce grande contribuição para a carcinogênese, evolução e resposta ao tratamento em pacientes com GB. Por isso, a sua expressão e suas vias de sinalização, como a via das MAP kinases (MAPK) ERK1/ERK2, encontram-se altamente desreguladas no GB. A inibição da expressão gênica do EGFR e Raf1, pelo supressor tumoral miR-7, é capaz de regular essa via de sinalização em múltiplos níveis resultando na sensibilização de linhagens celulares à radiação ionizante. A despeito do papel do miR-7 na sensibilização, os pacientes podem adquirir resistência ao tratamento. Portanto, o estudo de novos compostos capazes de modular a via de sinalização do EGFR torna-se importante. O objetivo do estudo é caracterizar o perfil de radiorresistência, e avaliar o efeito antitumoral e o mecanismo de ação do composto LQB-223 nas linhagens celulares de GB humano: A172, T98G e U251.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Linhagens celulares de GB: U251 (TP53, EGFR e PTEN mutados), T98G (TP53 e PTEN mutados) e A172 (PTEN mutado);
- Viabilidade Celular avaliada pelo ensaio de MTT;
- Avaliação do perfil do ciclo celular por citometria de fluxo;
- Morte celular e apoptose avaliada pela marcação de anexinaV/PI em citometria de fluxo e pela expressão de Procaspase-3 e Caspase-3 clivada;
- Expressão protéica de Procaspase-3, Caspase-3 clivada, p-H2AX, ERK, p-ERK, Ras, Hsc70 e β -actina avaliada por *Western blotting*;
- Expressão de miR-125b e miR-7 avaliada por PCR em tempo real pelo método TaqMan.

RESULTADOS

As linhagens T98G e A172 apresentaram um acúmulo expressivo de células em G2/M após a exposição às doses de radiação de 8, 16 e 24Gy. Estas doses induziram um aumento na fragmentação do DNA apenas nas linhagens U251 e T98G. Nossos dados apontam para a maior resistência das linhagens estudadas às baixas doses de radiação ionizante enquanto a linhagem A172 mostrou-se mais resistente a todas as doses utilizadas. O composto LQB-223 reduziu a viabilidade e a proliferação celular, induziu acúmulo na fase G2/M do ciclo celular, aumentou a fragmentação do DNA e a taxa da morte celular por apoptose nas linhagens de GB avaliadas. Os efeitos antitumorais induzidos pelo LQB-223 podem ser parcialmente explicados pelo aumento na expressão do miR-7, bem como pela diminuição na fosforilação da proteína ERK e da expressão da forma total da proteína Ras. Resultados preliminares na linhagem T98G mostram um aumento na fosforilação da proteína H2AX sugerindo que o LQB-223 induz quebra de dupla fita do DNA.

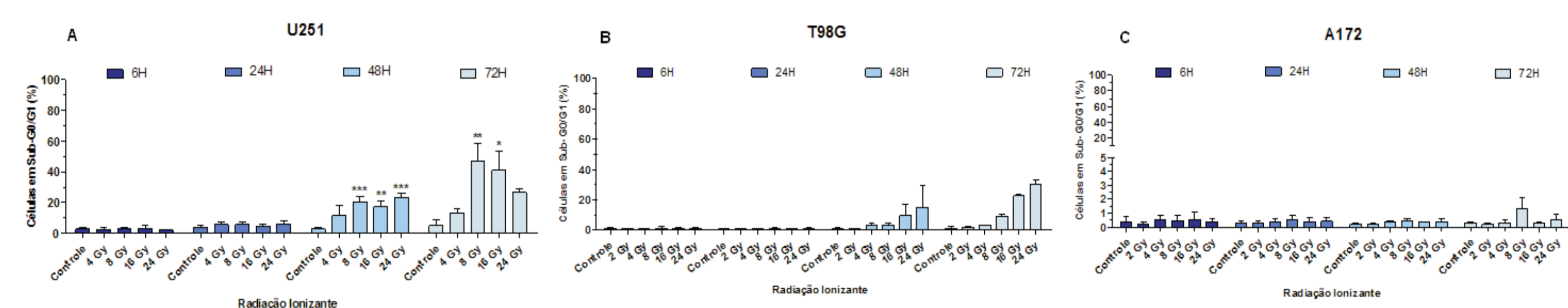


Figura 1. Fragmentação do DNA após exposição à radiação ionizante, analisada por citometria de fluxo. Porcentagem de células em sub-G0/G1 da linhagem U251 (A), T98G (B) e A172 (C) após exposição a diferentes doses de radiação ionizante por 6, 24, 48 e 72h. Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao DMSO

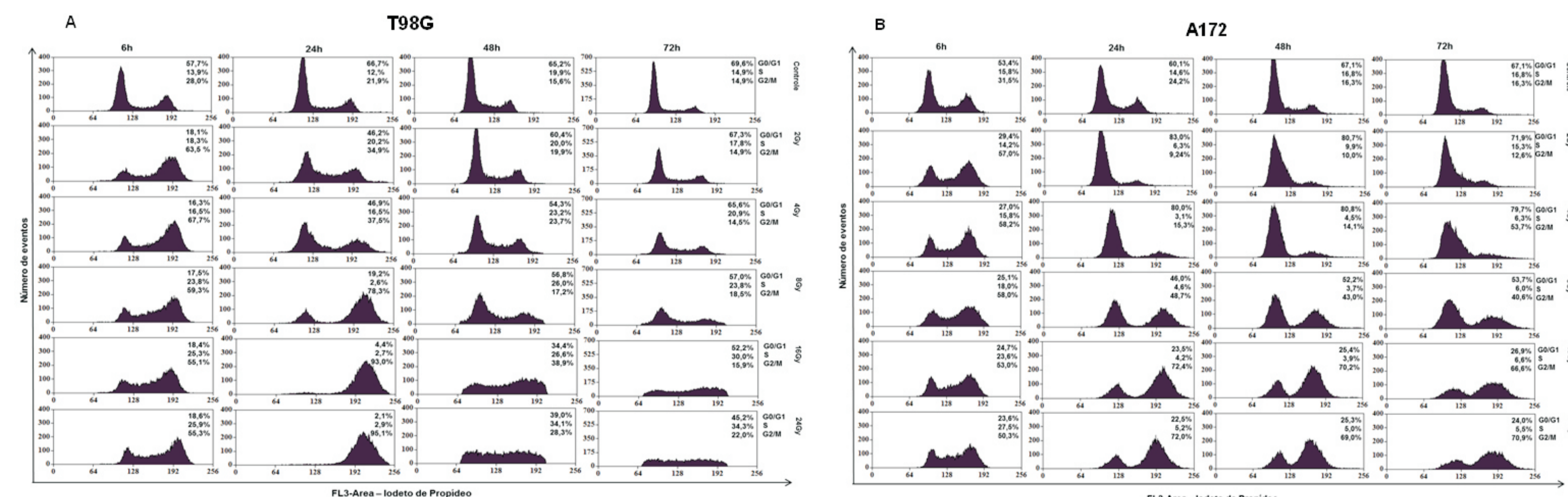


Figura 2. Histograma representativo do ensaio de ciclo celular das linhagens de glioblastoma T98G e A172 após exposição à radiação ionizante, avaliado por citometria de fluxo. A linhagem T98G (A) e a linhagem A172 (B) foram expostas a diferentes doses de radiação ionizante e incubadas por 6, 24, 48 e 72h. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

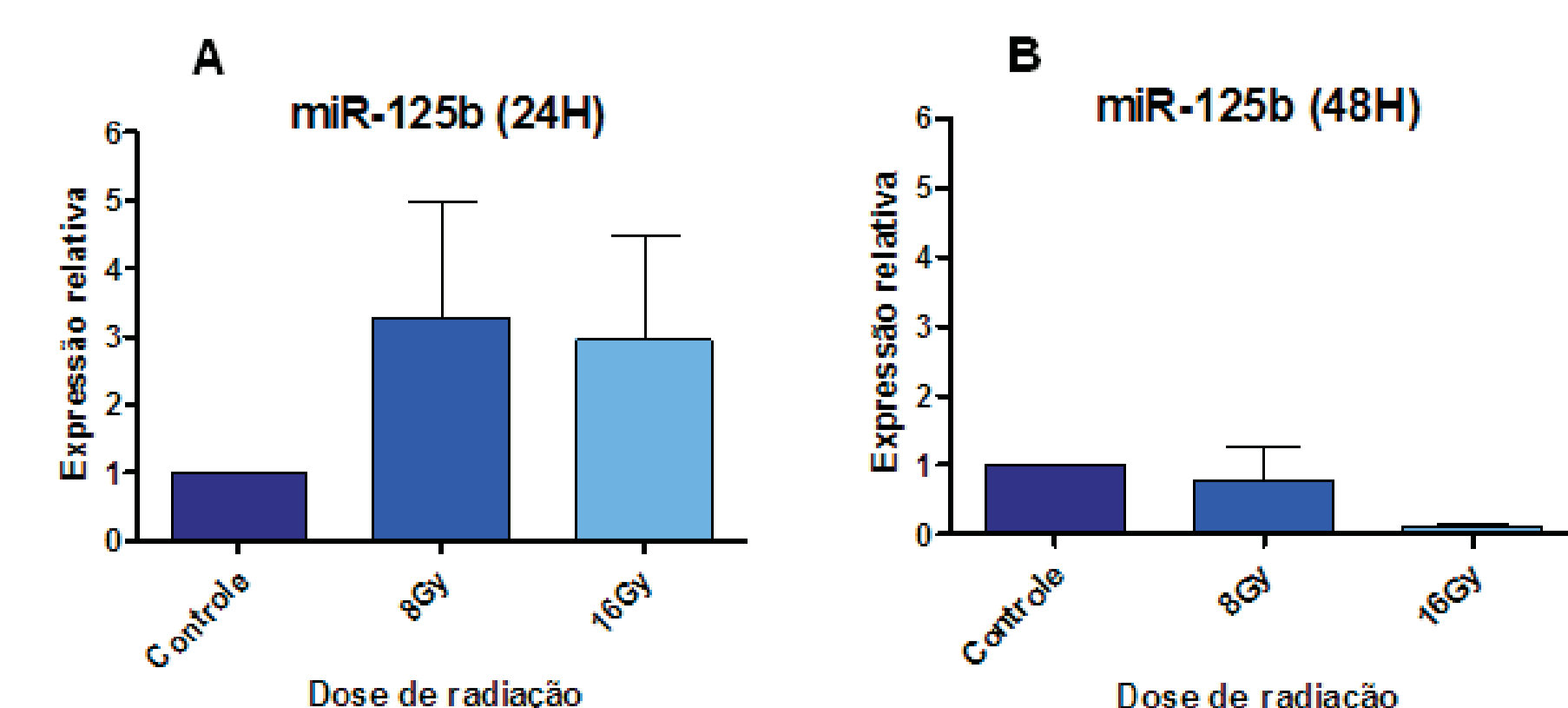


Figura 3. Quantificação relativa dos níveis de miR-125b, na linhagem U251 após exposição à radiação ionizante, avaliado por qRT-PCR. A expressão do miR-125b foi avaliada na linhagem U251, após exposição às doses de 8 e 16 Gy de radiação ionizante por 24 (A) e 48h (B). Os níveis de expressão relativa do microRNA são apresentados em número de vezes em relação ao controle. A expressão gênica foi normalizada pela expressão do snRNA endógeno RNU6B. Os valores representam a média de três experimentos independentes.

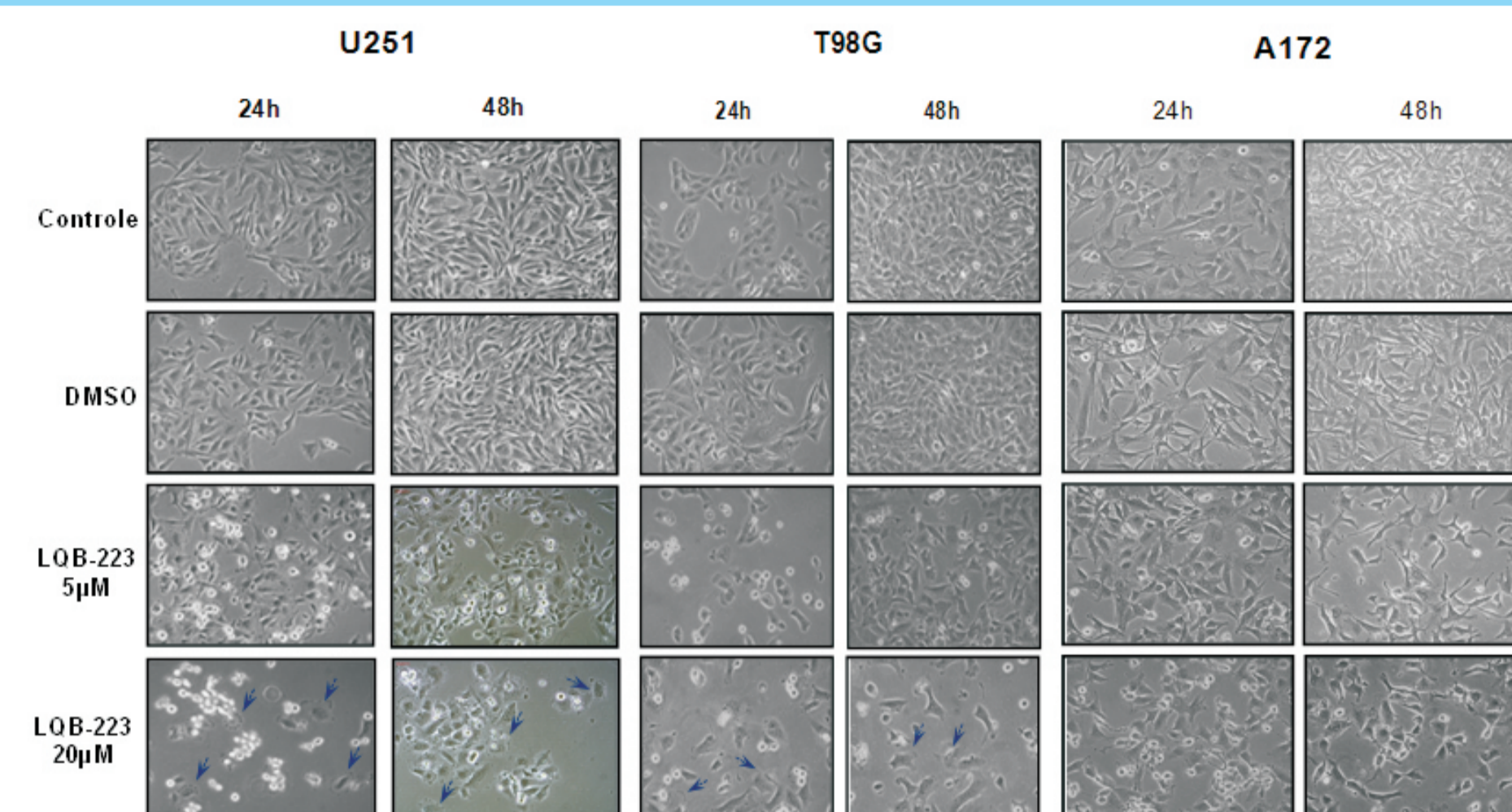


Figura 4. Morfologia celular das linhagens de glioblastoma U251, T98G e A172 após incubação com o novo composto LQB-223, obtida por microscópio óptico. Morfologia celular da linhagem U251, T98G e A172 após incubação com as concentrações de 5 e 20 μ M de LQB-223, por 24 e 48h. Setas azuis indicam células com mudança na morfologia. Imagem representativa, no aumento de 10X, de dois experimentos independentes.

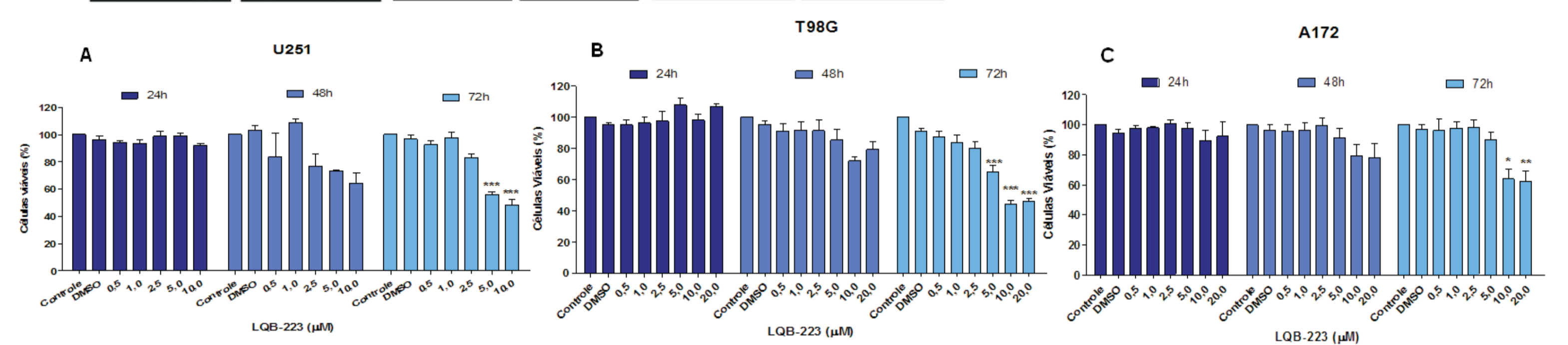


Figura 5. Viabilidade celular das linhagens U251, T98G e A172 após incubação com o novo composto LQB-223, avaliada pelo ensaio de MTT. Porcentagem de células viáveis da linhagem, U251 (A), T98G (B) e A172 (C) após incubação com diferentes concentrações de LQB-223 por 24, 48 e 72h. Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao DMSO.

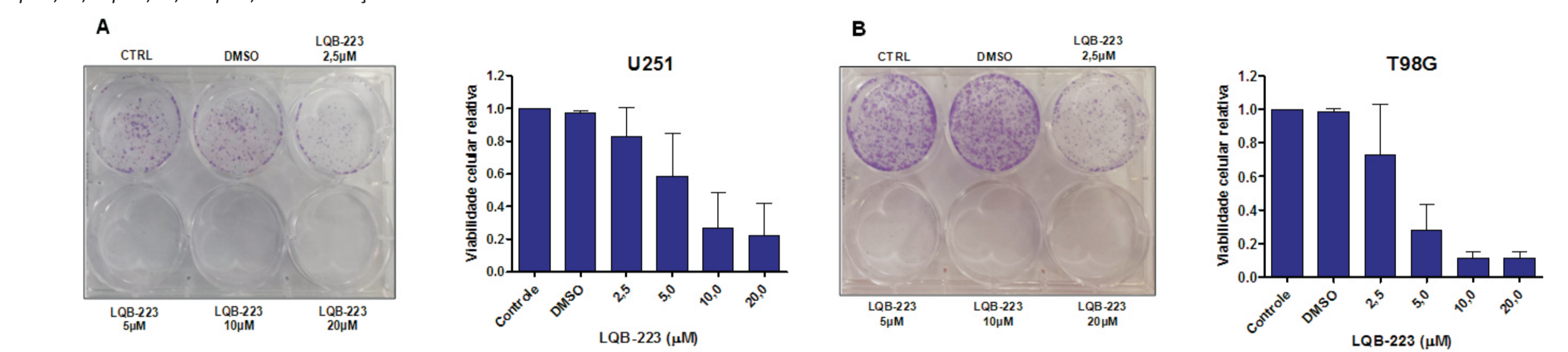


Figura 6. Ensaio clonogênico de formação de colônias da linhagem U251 e T98G após a incubação com o novo composto sintético LQB-223. Diferentes concentrações de LQB-223 foram incubadas durante 48h e o meio trocado após esse período. Colônias formadas após o tempo determinado foram coradas com cristal violeta e fotografadas, além de serem diluídas e quantificadas em espectrofotômetro, na linhagem U251 (A) e T98G (B). Imagens representativas de dois experimentos independentes.

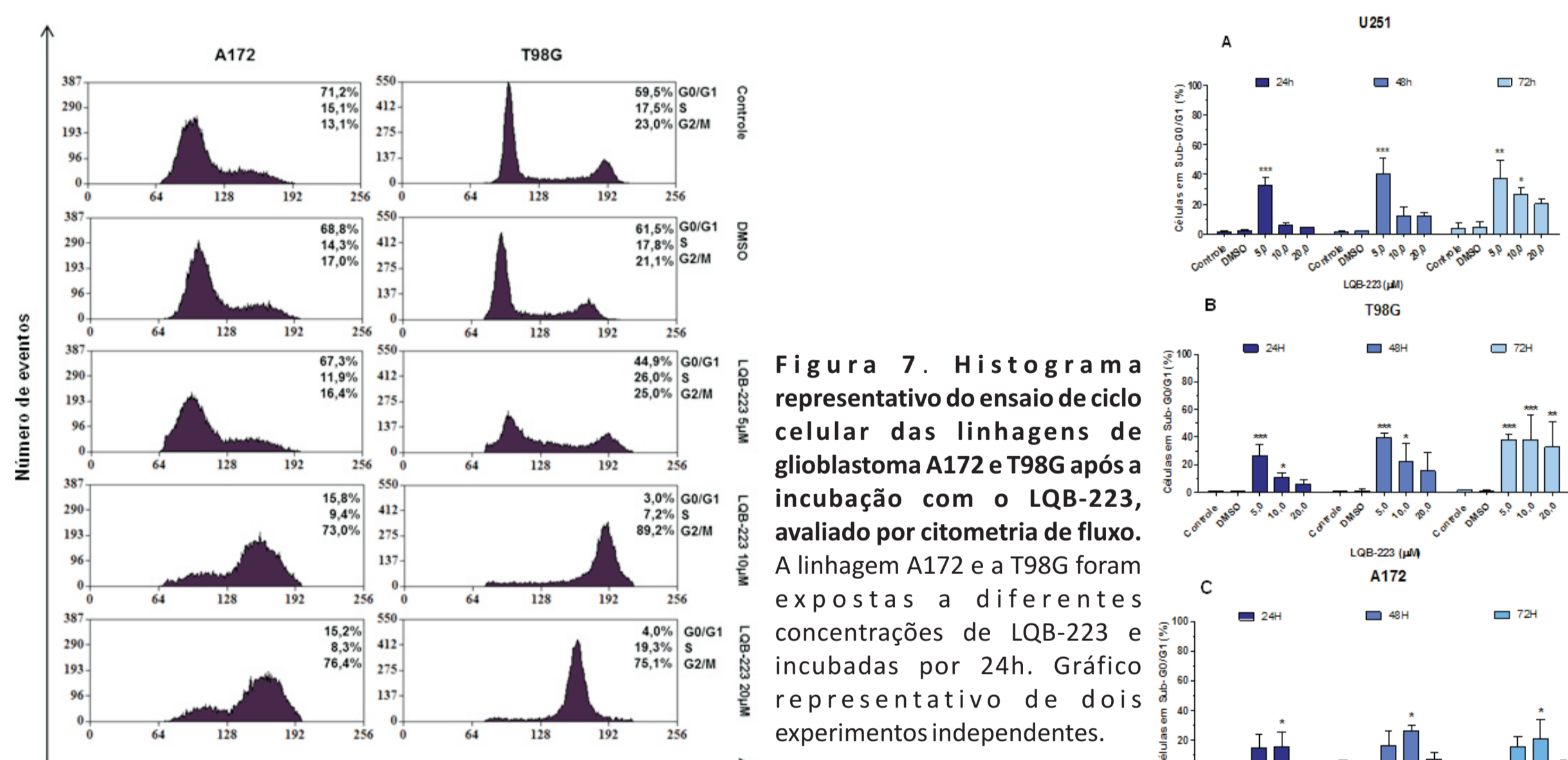


Figura 7. Histograma representativo do ensaio de ciclo celular das linhagens de glioblastoma A172 e T98G após a incubação com o LQB-223, avaliado por citometria de fluxo. A linhagem A172 e a T98G foram expostas a diferentes concentrações de LQB-223 e incubadas por 24h. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

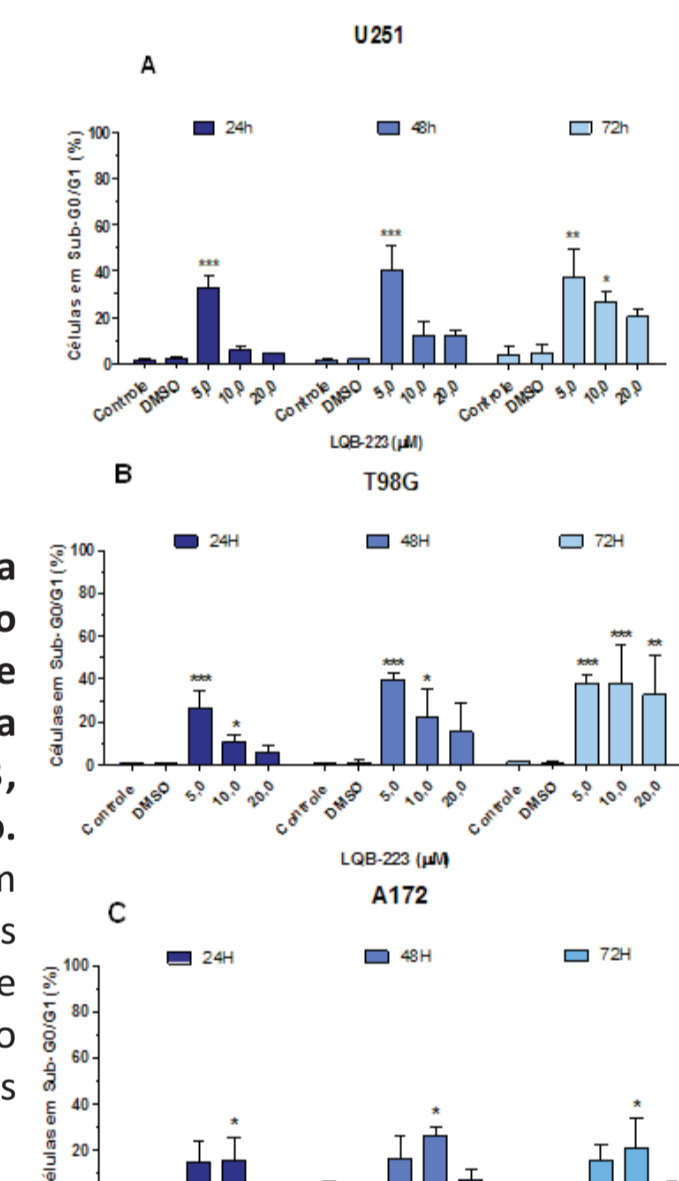


Figura 8. Fragmentação do DNA após o tratamento com LQB-223, analisada por citometria de fluxo. Porcentagem de células em sub-G0/G1 da linhagem U251 (A), T98G (B) e A172 (C) após o tratamento com 5, 10 e 20 μ M de LQB-223 por 24, 48 e 72h. Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao DMSO.

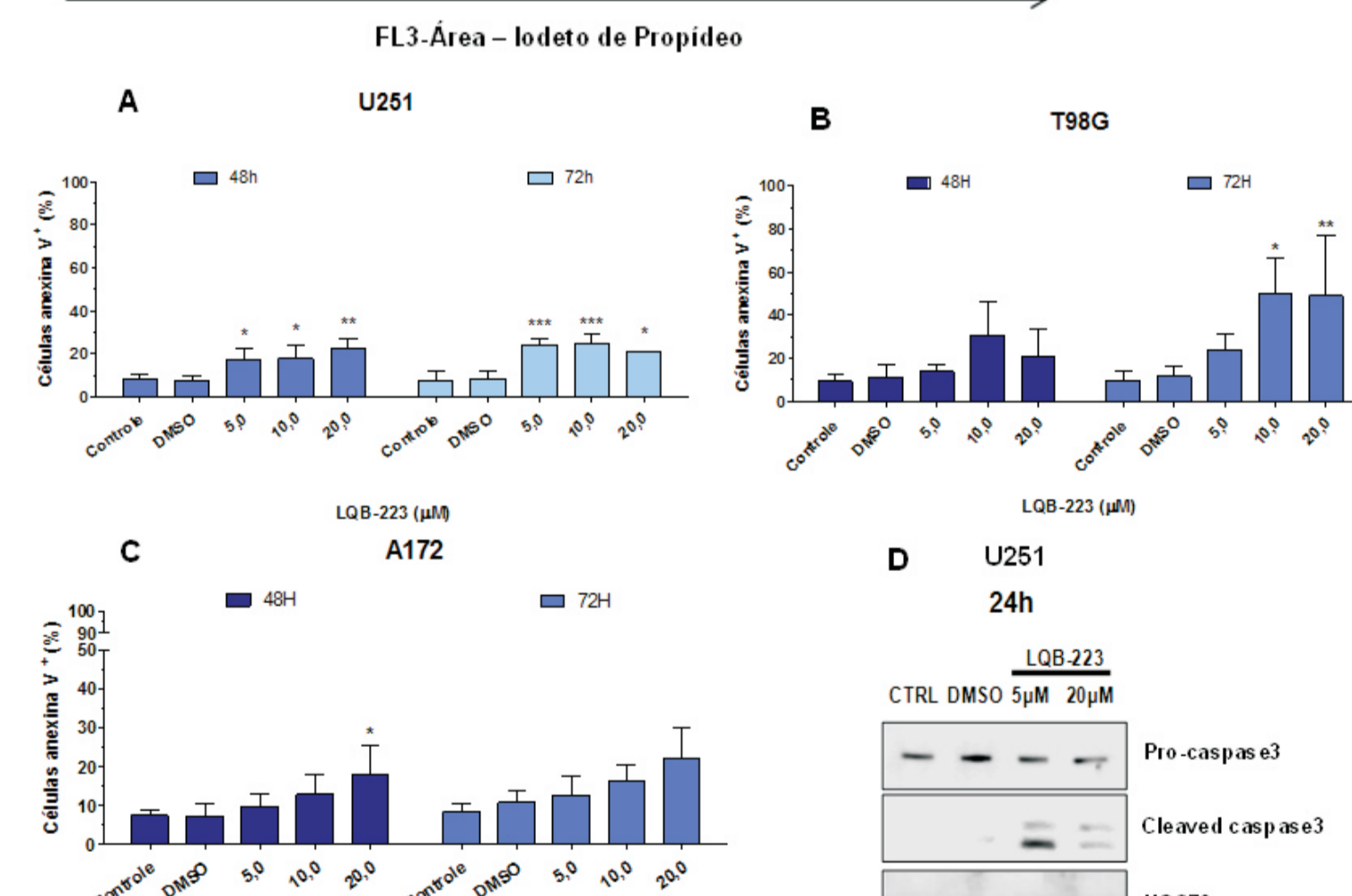


Figura 9. Morte celular por apoptose avaliada pelo ensaio de anexina V/PI e pela expressão de procaspase3 e caspase3 clivada após o tratamento com LQB-223. As linhagens U251 (A), T98G (B) e A172 (C) foram tratadas com 5, 10 e 20 μ M de LQB-223 e analisadas em citometria de fluxo quanto a marcação de anexina V/PI. A linhagem U251 foi exposta a concentrações de 5 e 20 μ M de LQB-223 por 24h, e os níveis proteicos de procaspase3 e caspase3 clivada avaliados por *Western blotting* (D). Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (células anexina V = anexina V / PI + anexina V / PI). Expressão de HSC-70 (70kDa) foi utilizado como controle endógeno. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao DMSO.

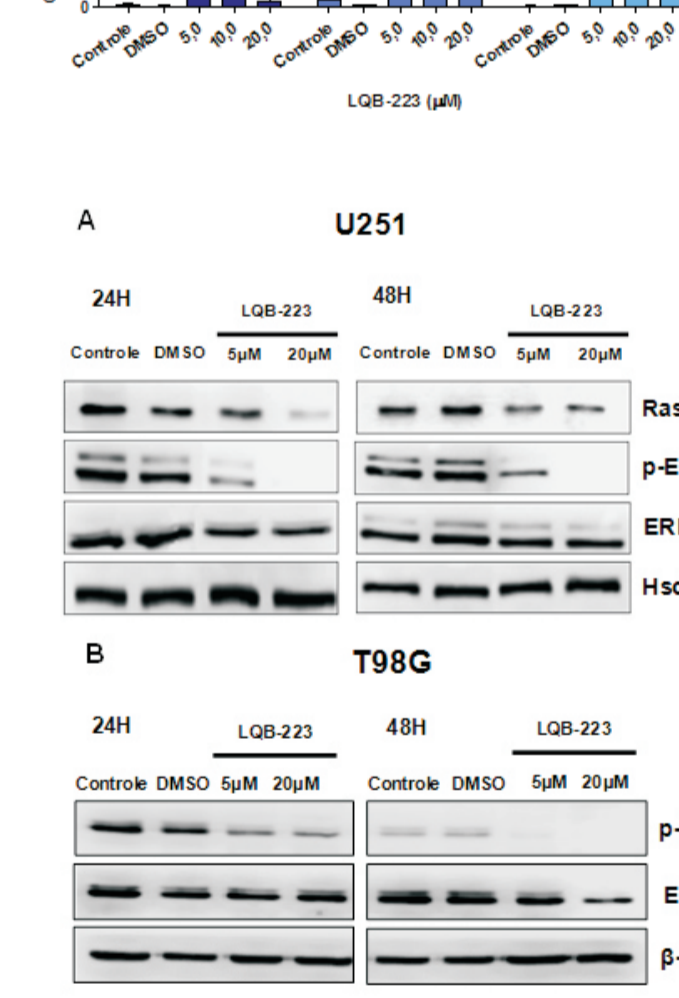


Figura 10. Vias de sinalização celular alteradas após o tratamento com LQB-223. As linhagens U251 (A) e T98G (B e C) foram tratadas com 5 e 20 μ M de LQB-223 por 24 e 48h, e os níveis proteicos de Ras, ERK1/2, p-ERK1/2 e p-H2AX analisados por *Western blotting*. A expressão de HSC-70 (70kDa) e β -actina foram utilizadas como controle endógeno. Figura representativa de três experimentos independentes

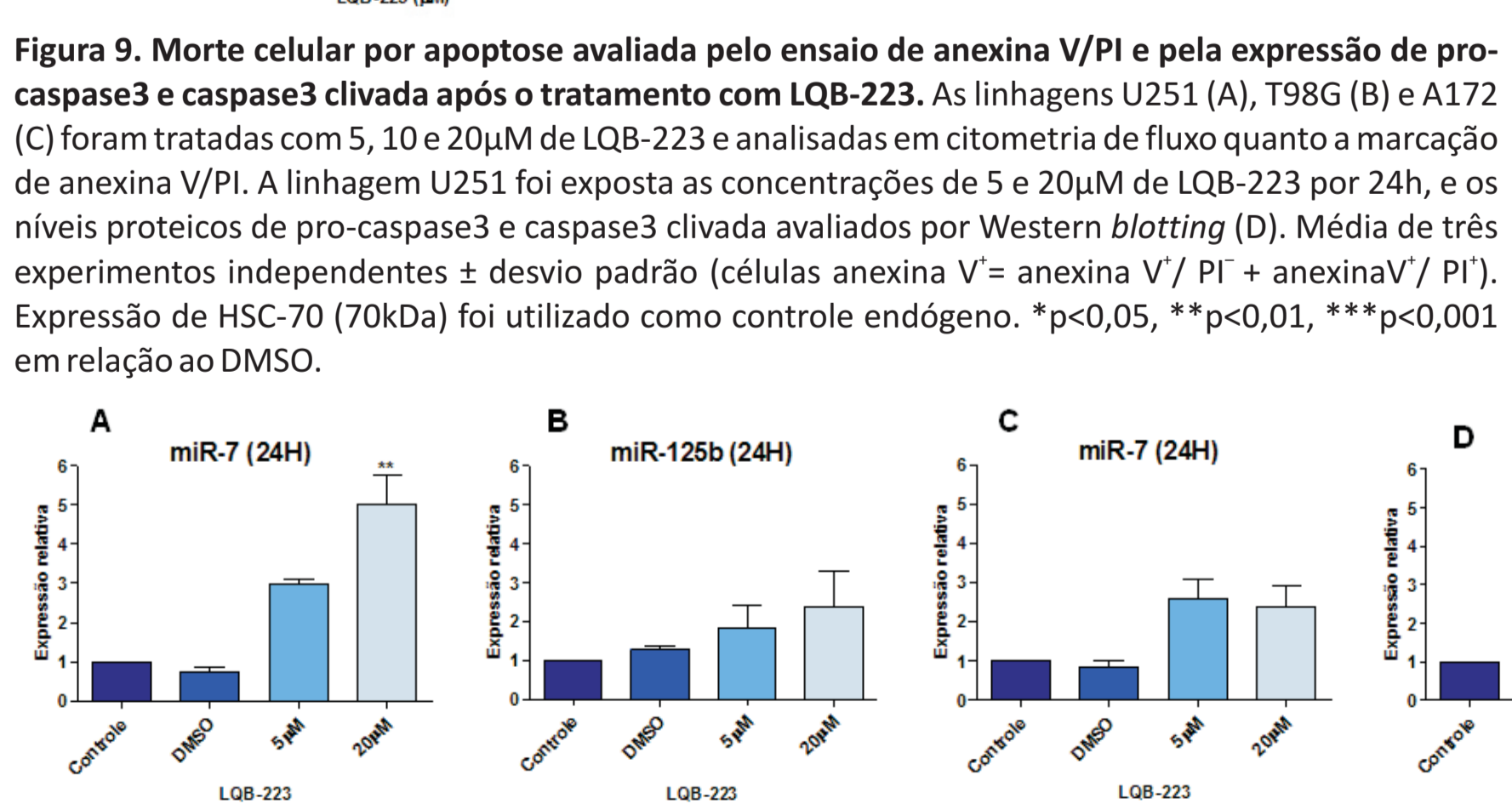


Figura 11. Quantificação relativa dos níveis de miR-125b e miR-7 após a incubação com LQB-223. As linhagens U251 (A e B), T98G (C) e A172 (D) foram tratadas com 5 e 20 μ M de LQB-223 por 24h, e os níveis de expressão relativa do miR-125b e miR-7 avaliados por qRT-PCR. A expressão gênica foi normalizada pela expressão do snRNA endógeno RNU6B. Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão.

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados mostram que o LQB-223 possui um grande potencial antitumoral tanto nas linhagens de GB sensíveis quanto nas resistentes à radiação ionizante e que as alterações observadas podem ser explicadas pela inibição em diferentes níveis da via do EGFR, via o aumento do miR-7.