

# Efeito da Combinação de Temozolomida e Celecoxibe em Linhagem Celular de Glioblastoma Multiforme Humano U251MG

Gabrielle C. Cosme<sup>1</sup>, Felipe U. Conter<sup>2</sup>  
Orientadora: Dra Ivana Grivicich<sup>3</sup>  
Universidade Luterana do Brasil

<sup>1</sup>Acadêmica do Ensino Médio, Iniciação Científica Júnior CNPq no Laboratório de Biologia do Câncer, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; <sup>2</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; <sup>3</sup>Professora do Curso de Biomedicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Coordenadora do Laboratório de Biologia do Câncer, ULBRA

## INTRODUÇÃO

Sendo uma das principais causas de morte no mundo, o câncer é cada vez mais estudado em busca de tratamentos e terapias. Dos tumores do Sistema Nervoso Central, o Glioblastoma Multiforme (GBM) é o mais comum e agressivo, seu tratamento geralmente envolve ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A Temozolomida (TMZ) é o principal quimioterápico utilizado para esse tipo de neoplasia. Em estágios mais avançados, onde o GBM já encontra-se em tecido adjacente, a ressecção cirúrgica não mais se apresenta como uma forma viável de tratamento, o que resulta no tratamento apenas com o quimioterápico. Apesar da eficácia da TMZ, células neoplásicas possuem capacidade de se adaptarem, desenvolvendo formas de se tornarem resistentes. Assim, a busca por terapias adicionais visa aumentar a eficácia terapêutica, combinando quimioterápicos para tal. O Celecoxibe (CLX) é um inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (COX-2). Em tumores de sistema nervoso central já foi detectado uma maior expressão de prostaglandinas por conta da super-expressão da COX-2, o que justificaria o uso de inibidores de COX-2 como o CLX para redução da proliferação de linhagens celulares de GBM.

Terapias onde se administram fármacos com princípios ativos diferentes podem apresentar melhores resultados, diminuindo a resistência dos tumores.

## OBJETIVO

Investigar o efeito dos fármacos Celecoxibe e Temozolomida isolados e combinados na linhagem celular de glioblastoma multiforme humano U-251MG.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### CULTIVO E MANUTENÇÃO

A linhagem de glioblastoma multiforme humano U-251MG foi mantida em meio de cultura Dulbecco contendo 2% (p/v) L-glutamina e 15% (v/v) de soro fetal bovino, a temperatura de 37°C, umidade relativa mínima de 95%. Para os experimentos, células em crescimento exponencial foram desprendidas dos frascos de cultura usando Tripsina-EDTA.

### TRATAMENTO COM CELECOXIBE (CLX) E TEMOZOLAMIDA (TMZ)

Inicialmente, a linhagem celular U-251MG foi tratada com doses seriadas de CLX (2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 160 µM) ou TMZ (10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM, 500 µM) por 72 h. Essas concentrações foram obtidas a partir de um estudo piloto. A seguir os dois fármacos foram testados em combinação. No co-tratamento as células foram tratadas com CLX e TMZ simultaneamente, nas concentrações já citadas, por 72 h. No pré-tratamento foram inicialmente expostas às mesmas doses de CLX por 24 h. Após este período, o CLX foi retirado e adicionado TMZ por 48 h.

### AValiação da Citotoxicidade

Vinte e quatro horas antes dos tratamentos com os fármacos, as células foram incubadas em microplacas de 96 poços, em uma densidade de 4 x 10<sup>4</sup> células/100µL/poço. Cada experimento incluiu um controle contendo células somente com meio de cultura e um controle sem células.

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de Sulforodamida B (SRB).

### ANÁLISE DO EFEITO DA COMBINAÇÃO CLX E TMZ

Os efeitos das interações entre CLX e TMZ foram avaliados pela análise de isoblograma, utilizando o software CompuSyn® (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ; versão 1.0). Este programa permite avaliar os índices de combinações, indicando se houve Sinergismo, Adição ou antagonismo.

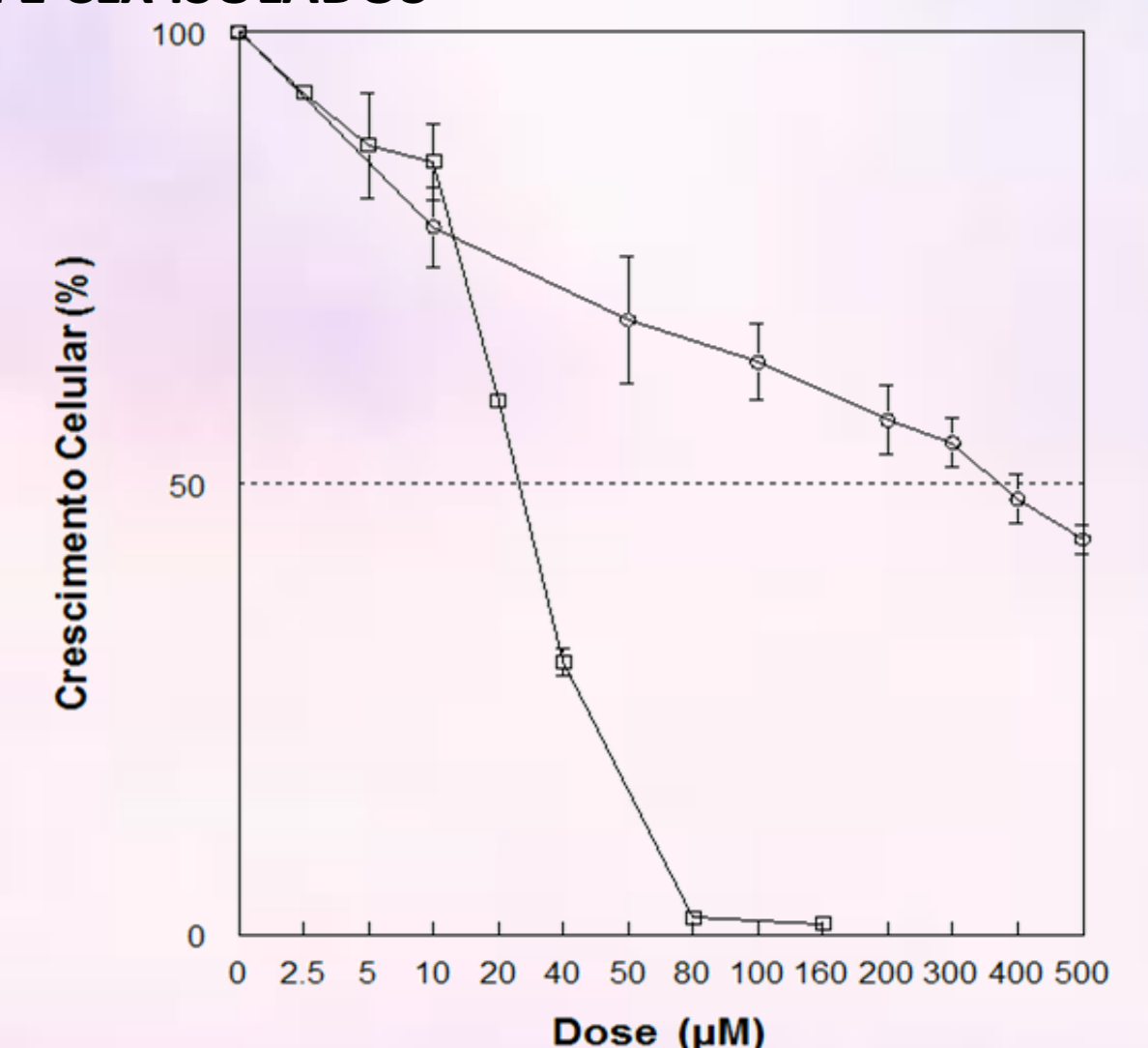
## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwala SS, Kirkwood JM. Temozolomide, a novel alkylating agent with and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352: 987-96.  
Aizer AA, Arvold ND, Catalano P, et al. Adjuvant radiation therapy, local recurrence, and the need for salvage therapy in atypical meningioma. *Neuro Oncol.* 2014;16(11): 1547-53.  
Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000;6: 2006-11.  
Kang KB, Zhu C, Yong SK, et al. Enhanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: Induction of DNA damage leading to p53 dependent G1 cell cycle arrest and autophagy. *Mol Cancer.* 2009;8: 66-81.  
Noda SE, El-Jawahri A, Patel D, et al. Molecular advances of brain tumors in radiation oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2009;19(3):171-8.

## RESULTADOS

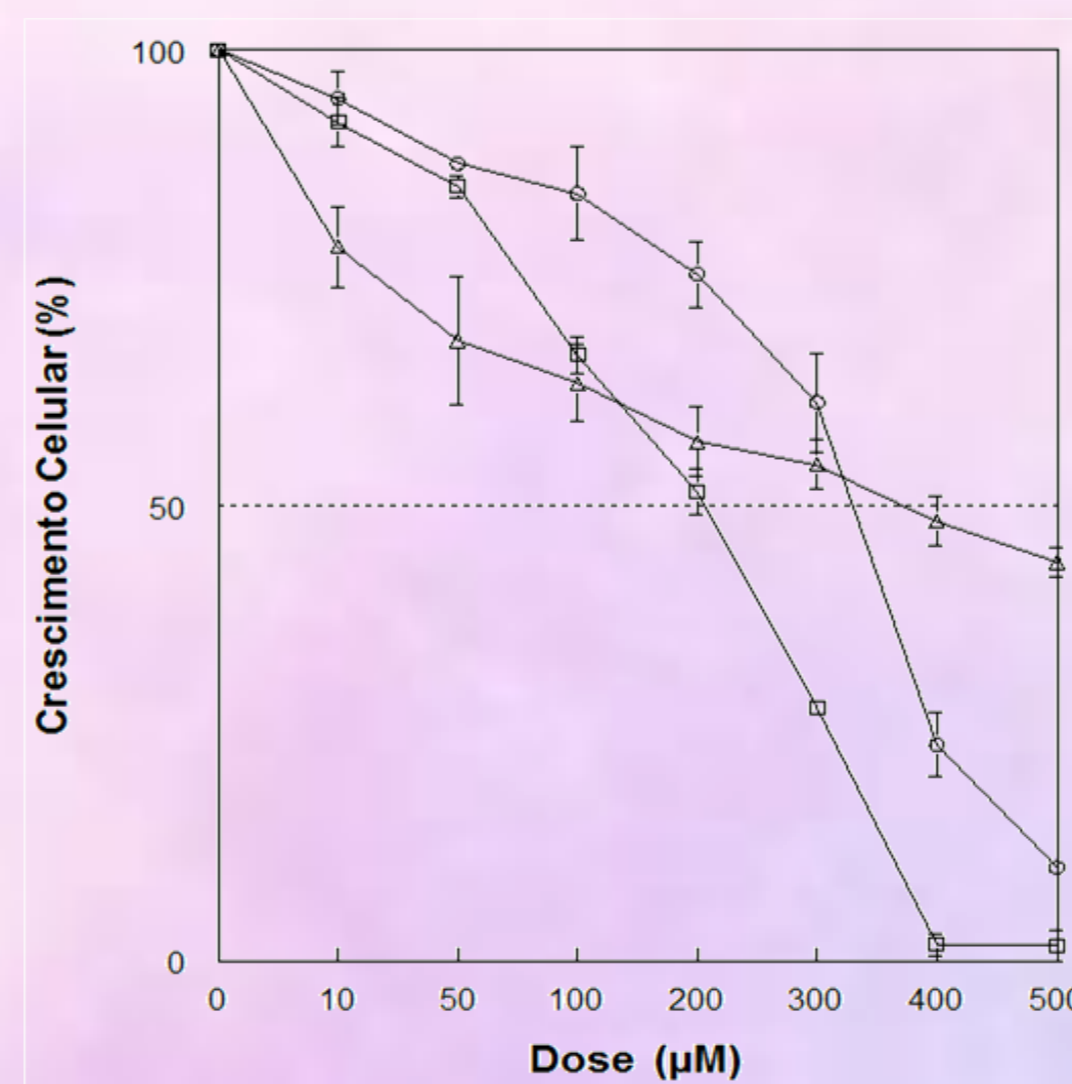
### AValiação de Citotoxicidade com TMZ e CLX Isolados

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo ensaio colorimétrico de SRB e determinada a dose de inibição de 50% do crescimento celular (IC<sub>50</sub>) em cultura, utilizando a curva de dose-resposta gerada a partir exposição dos quimioterápicos por 72 h. Observa-se que o CLX apresenta uma dose de IC<sub>50</sub> consideravelmente menor (25 µM) quando comparado com a TMZ (IC<sub>50</sub> de 373,7 µM), demonstrando que a linhagem celular U251MG é mais sensível ao CLX do que à TMZ.



Inibição do crescimento celular na linhagem celular de glioblastoma humano U251MG pelo CLX (□) ou TMZ (●) por 72 h. Os resultados são média ± DP (barras verticais; n ≥ 6).

### AValiação de Citotoxicidade com os Tratamentos Combinados

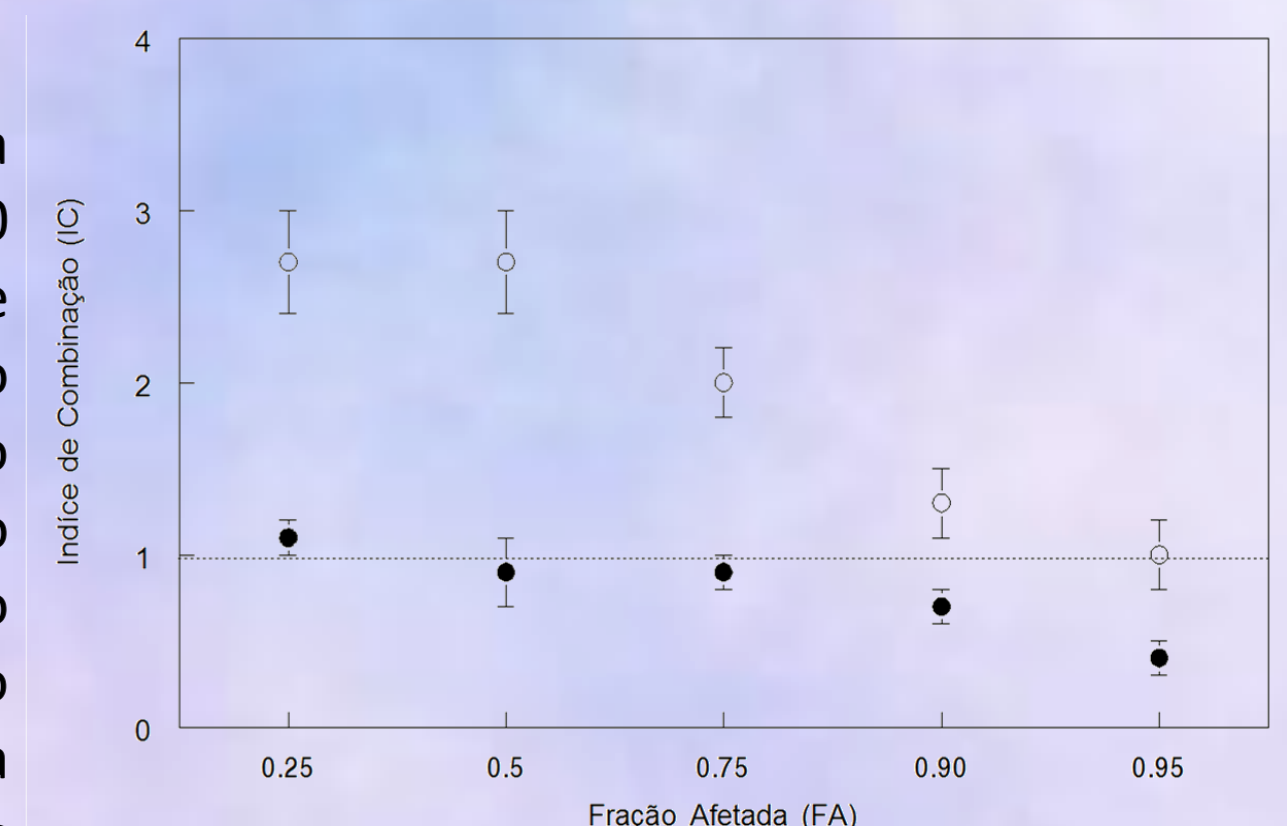


Inibição do crescimento celular na linhagem celular de glioblastoma humano U251MG pela TMZ isolado por 72 h (Δ); co-tratamento com CLX e TMZ por 72 h (□) ou Pré-tratamento com CLX por 24 h seguido da TMZ por 48h (○). Os resultados são média ± DP (barras verticais; n ≥ 6).

A seguir analisamos o crescimento celular após o tratamento com TMZ e as duas drogas juntas seguindo os protocolos de pré-tratamento e co-tratamento. Quando utilizado somente TMZ a dose necessária para inibir 50% do crescimento celular foi de 373,7 µM, enquanto que no pré-tratamento foi de 321,6 µM e no co-tratamento 201,7 µM. Comparando os resultados de IC<sub>50</sub> da TMZ sozinha e do pré-tratamento, podemos dizer que não houve uma diferença significativa entre os valores de IC<sub>50</sub>. O efeito mais significativo ocorreu quando comparamos os resultados com o co-tratamento.

### ANÁLISE DE INTERAÇÃO ENTRE CLX E TMZ

A avaliação da interação entre o CLX e a TMZ (Figura 8), após determinar que o IC<sub>50</sub> do co-tratamento se mostrou mais eficiente que a ação isolada da TMZ, indica a ação sinérgica e de adição quando observamos o co-tratamento (CI médio 0,8 ± 0,3). No entanto, o pré-tratamento com CLX não produziu resultados que potencializassem o efeito da TMZ, atuando de forma antagonista na maioria das situações vistas (CI médio 1,9 ± 0,8).



Análise do efeito de múltiplas drogas da combinação CLX/TMZ na linhagem celular U251MG após tratamento com CLX simultâneo com TMZ por 72h (●); CLX por 24 h seguido da TMZ por 48h (○). IC < 1, = 1, ou > 1 indicam sinergismo, adição, ou antagonismo, respectivamente. Os resultados são média ± DP (barras verticais; n ≥ 6).

## CONCLUSÃO

Nosso trabalho permitiu concluir:

- Uma maior sensibilidade da linhagem U251MG ao Celecoxibe, necessitando de uma dose muito menor do que a TMZ para atingir o mesmo potencial citotóxico.
- A combinação dos dois agentes, demonstrou uma potencialização na citotoxicidade com o co-tratamento em relação a TMZ isolada e ao pré-tratamento.
- A avaliação por isoblograma expressou o efeito de adição e sinergismo, quando no protocolo de co-tratamento. Em contrapartida, o protocolo de pré-tratamento mostrou uma interação antagonista entre os fármacos, reduzindo o efeito de um dos agentes isolados. O CLX utilizado anteriormente (pré-tratamento) diminui o efeito da TMZ, exceto em doses mais altas que apresentou efeito aditivo.