

# AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIMETIL E MONOMETIL FUMARATO SOBRE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA IN VITRO

Daiane de Matos de Lima

Fatec José Crespo Gonzales – Sorocaba - dlima8313@gmail.com

Elaine Conceição de Oliveira

Fatec José Crespo Gonzales – Sorocaba - elainecoliveira@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

O câncer é um relevante problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a segunda principal causa de mortalidade entre as doenças não transmissíveis, além de ser responsável por 9,3 milhões de mortes a nível mundial (Bayable et al, 2022). O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral primário mais comum e agressivo dentre as neoplasias. Este tipo de tumor é classificado como glioma de grau IV, cuja sobrevida é de três a cinco anos após o diagnóstico, a prevalência é de cerca 2,2% pacientes apenas. O GBM é caracterizado por variações na genética e epigenética entre as células tumorais, além de possuir uma capacidade de comunicação e manipulação de outras células nos arredores do cérebro, implicando diretamente na progressão do tumor e resistência à terapia. Atualmente, o tratamento padrão de GBM se baseia em quimio e radioterapia concomitante (um total de 60 Gy), combinada com temozolomida intravenosa diária (TMZ), por cerca de 6 a 12 meses. Porém, mesmo com os recentes avanços terapêuticos, ainda não foi obtido um aumento relevante na taxa de sobrevida de pacientes com GBM. Por esse motivo, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento deste tipo de câncer. Compreender as múltiplas formas de comunicação entre o tumor e as células ao seu redor pode ser um grande aliado para desbravar novas vias para o tratamento (Broekman et al, 2018; Shafer et al, 2020; Milad et al, 2022).

Há uma incessante busca por novas drogas anticâncer, contudo a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos podem apresentar inúmeros desafios até que a droga possa ser aprovada no mercado. O reaproveitamento de medicamentos já aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) torna-se uma solução viável para essa problematização. Entre esses medicamentos que

apresentam grande potencial anticancerígeno, está o Dimethyl fumarato (DMF), um éster de ácido fumárico (FAE) aprovado para o tratamento de psoríase e esclerose múltipla (EM) (Brennan et al., 2021; LU et al., 2022). Foi observado em diversos estudos que o DMF possui efeitos farmacológicos antioxidantes e anticancerígenos, além de diversas ações biológicas como moduladora das funções imunes. A droga quando ingerida é rapidamente metabolizada para a sua forma biológica ativa, o monomethyl fumarato (MMF). Devido à característica heterogênea do GBM, se faz necessários estudos sobre os efeitos deste medicamento frente o glioblastoma (Ahmadi-Beni et al, 2019); Wynn e Kourakis, 2020).

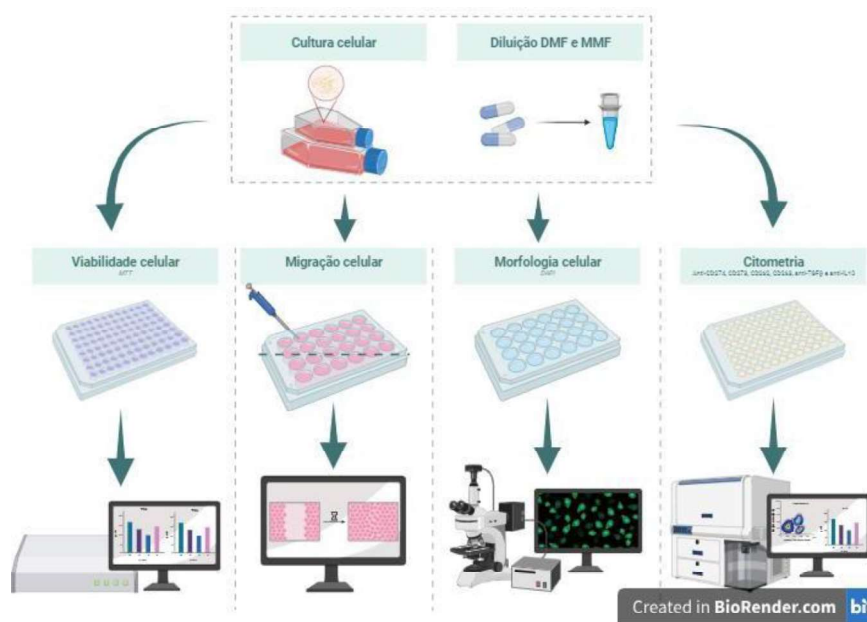
## OBJETIVO

O objetivo deste projeto é avaliar os efeitos provocados pelo dimethyl fumarato (DMF) e o monomethyl fumarato (MMF) em relação às linhagens tumorais de glioblastoma multiforme para entrega controlada de drogas com nanopartículas de carbono.

## METODOLOGIA

As linhagens celulares glioblastoma NG97 e fibroblasto murino L929 foram expandidas e cultivadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> e 75cm<sup>2</sup> até atingirem uma confluência ideal. Então elas foram tripsinizadas e distribuídas em placas de 96, 48 e 24 poços para os ensaios de viabilidade, migração, morfologia e citometria de fluxo. Os medicamentos DMF e MMF foram diluídos em solução contendo 200µL de dimetil sulfoxido (DMSO) e 800µL de Tampão Salino Fosfato (PBS) pH 7,4 para cada 1 mg de cada fármaco, e foram acrescentados aos poços nas concentrações de 10 µg e 20 µg de cada medicamento, além das concentrações da solução DMSO 20% + PBS 80% sozinha em 10 µL e 20 µL. Após 24 horas de incubação, cada placa era analisada ou tratada de acordo com cada ensaio, como demonstrado na estratégia de ensaio da **figura 1**.

**Figura 1: Metodologia desenvolvida através do site Biorender.**



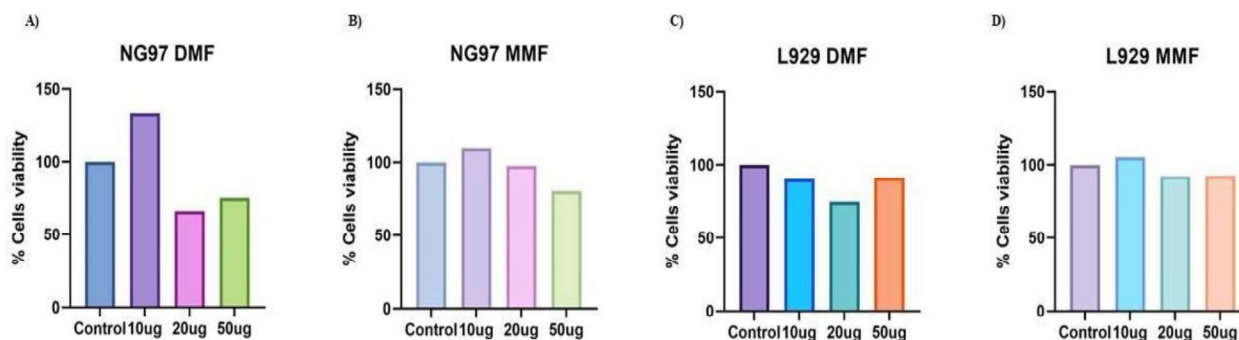
Fonte: a autora.

**RESULTADOS**

O estudo nos possibilitou entender quais as melhores concentrações dos medicamentos Dimethyl fumarato e Monomethyl fumarato. E de acordo com a literatura a concentração de DMF que demonstrou a maior redução no crescimento celular foi 20µg/ml. Em

contraposição, o MMF apresentou um estímulo no crescimento celular em relação às concentrações de 10 e 20µg/ml. Após realizar diversos experimentos com diferentes concentrações observamos que as melhores concentrações para serem estudadas eram de 10 e 20µg/ml. A linhagem de L929 teve um comportamento parecido com a linhagem de NG97, contudo numa proporção bem menor.

**Figura 2: Ensaio de viabilidade das linhagens de glioblastoma (NG97) e fibroblasto murino (L929).**

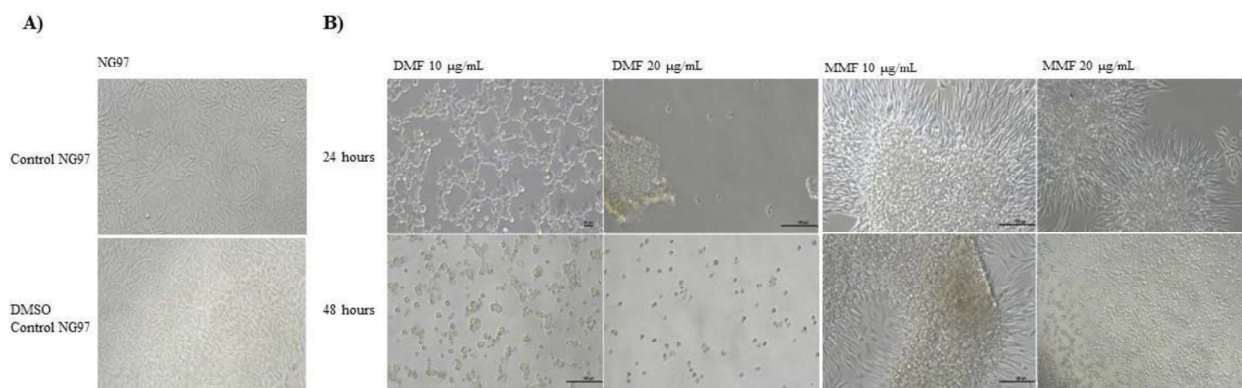


Fonte: A autora.

É possível comprovar esse fato ao observar o ensaio de morfologia, onde o DMF apresenta uma visível diminuição no crescimento celular em comparação com a fotografia A controle NG97, tanto em 10µg/mL quanto e principalmente em 20µg/mL.

No entanto, ao compara com o MMF 10µg/mL, o crescimento celular da linhagem de glioblastoma torna se totalmente agressivo frente ao controle, formando placas tridimensionais no formato de pequenos tumores.

**Figura 3: Ensaio de morfologia**

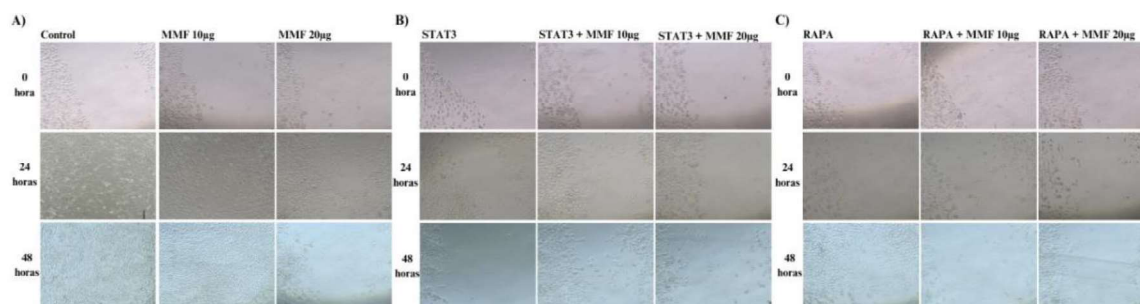


Fonte: A autora.

Ao realizar o ensaio de migração, foi observado que os poços tratados e não tratados (*Control*) com MMF apresentam migração parcialmente completa em 24 horas e totalmente completa em 48 horas (A). Ao inserir os inibidores STAT3 e Rapamicina (sozinhos ou combinados com o MMF 10 e 20µg/mL), foi identificada uma mudança na morfologia celular da

linhagem frente ao controle. Ao adicionar o medicamento nota-se uma singela reversão na fenda comparada ao inibidor da proteína STAT3 sozinho. Já o inibidor de mTor Rapa teve uma notável influência no crescimento celular da linhagem NG97, e combinado com o MMF 20µg/mL não houve nenhum avanço na fenda (B e C).

**Figura 4: Ensaio de migração**

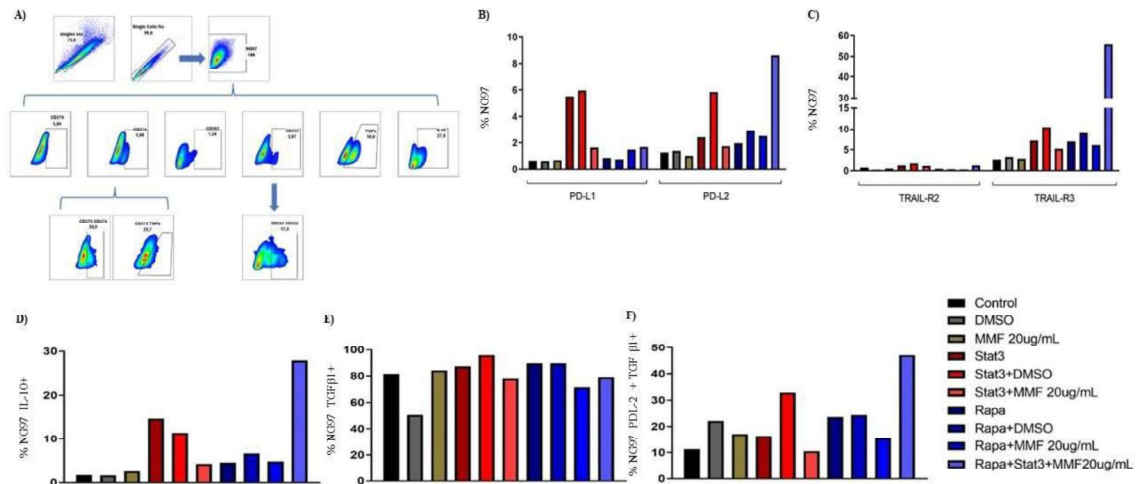


Fonte: A autora.

A estratégia de gates permite a análise em porcentagem de marcadores de superfície e intracitoplasmáticos na linhagem NG-97 (5A). Frente ao ensaio de citometria de fluxo, foi identificado que o MMF 20µg/mL não obteve relevante aumento em relação ao controle tratado e não tratado com DMSO, mas quando combinado com os dois inibidores revelou um aumento de expressão de PDL-2 (5B). Ao observar os tratamentos expostos ao TRAIL-R2 evidência que os receptores estão diminuídos em comparação ao TRAIL-R3, que foi mais expresso dentre todos os tratamentos (5C). Neste experimento também foram avaliadas as citocinas intracelulares IL-10 e TGFβ1 que possuem um importante papel na regulação do

sistema imune e homeostase tecidual normal e no câncer. A resposta do MMF aliados aos inibidores de Stat3 e Rapa mostraram que nesta concentração, a expressão desta citocina também não foi elevada nestes tratamentos. Novamente a combinação dos três tratamentos resultou em uma superexpressão de IL-10. Porém em relação à expressão de TGF-β1 pelas NG-97 os resultados mostraram uma alta expressão desta citocina em praticamente todos os tratamentos, com exceção do DMSO (5C e 5E). A diminuição de células duplo-positivas que (PDL-2+ TGFβ1+) foram observadas nos tratamentos Stat3+MMF 20µg/mL e Rapa+MMF 20µg/mL, quando comparados aos seus próprios controles Stat3 e Rapa (5F).

Figura 5: Ensaio de citometria.



Fonte: A autora.

## CONCLUSÃO

- Pode-se concluir que as melhores concentrações a serem estudadas foram as de 10.e 20 µg/mL;
- O DMF apresentou uma maior significância na diminuição do crescimento celular em relação ao MMF, contudo, ao ingerir o DMF ele rapidamente é metabolizado na sua forma biologicamente ativa MMF;
- A concentração de 10µg/mL de MMF é a mais estimuladora do crescimento celular da linhagem NG97;
- Os inibidores STAT3 e Rapacina apresentam grande influência no crescimento e morfologia celular da linhagem de GBM *in vitro*.
- Houve uma superexpressão da citocina TRAIL-R3 em conjunto com os tratamentos da linhagem de glioblastoma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI-BENI, R. et al. Role of dimethyl fumarate in the treatment of glioblastoma multiforme: A review article. **Iran J Neurol.**18(3):127-133, 2019.
- BAYABLE, A. et al. Delay in health-seeking behaviour and associated factors among adult patients with cancer in Ethiopia: a multicentre cross-sectional study. **BMJ Open**, v. 13, n. 8, p. e071406, 1 ago. 2023.
- LU, H. et al. Ivermectin synergizes sorafenib in hepatocellular carcinoma via targeting multiple oncogenic pathways. **Pharmacol Res Perspect.** 2022 Jun;10(3):e00954.
- MILAD, S. et al. Effects of Dimethyl Fumarate on the

Karnofsky Performance Status and Serum S100β Level in Newly Glioblastoma Patients: A Randomized, Phase-II, Placebo, Triple Blinded, Controlled Trial. v. 11, p. e1897–e1897, 31 maio 2022.

PIPERI, C.; PAPAVALASSILIOU, K. A.; PAPAVALASSILIOU, A. G. Pivotal Role of STAT3 in Shaping Glioblastoma Immune Microenvironment. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1398, 6 nov. 2019.