

Investigação do efeito antitumoral da doxazosina sobre linhagem de glioma de rato C6



UFRGS **XXV SIC**
PROFESQ Salão Iniciação Científica

CB - Ciências Biológicas

Alice Hoffmann de Quadros¹, Christianne Gazzana Salbego².

¹Autora, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Orientadora, Laboratório de Neuroproteção e Sinalização Celular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

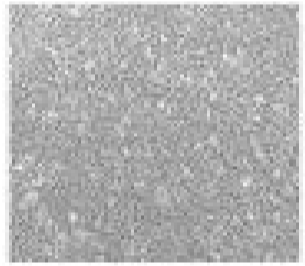
INTRODUÇÃO

Dentre os vários tipos de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), os mais frequentes e devastadores são os gliomas. O tratamento dos gliomas é atualmente um dos grandes desafios da oncologia. Devido a dificuldade de tratamento desses tumores, torna-se relevante a investigação de novas substâncias com potencial antitumoral. A doxazosina, o fármaco alvo desse estudo, constitui a classe terapêutica dos bloqueadores adrenérgicos, apresentando em sua estrutura química o anel quinazolinico, similar aos antineoplásicos utilizados na clínica.

MÉTODOS

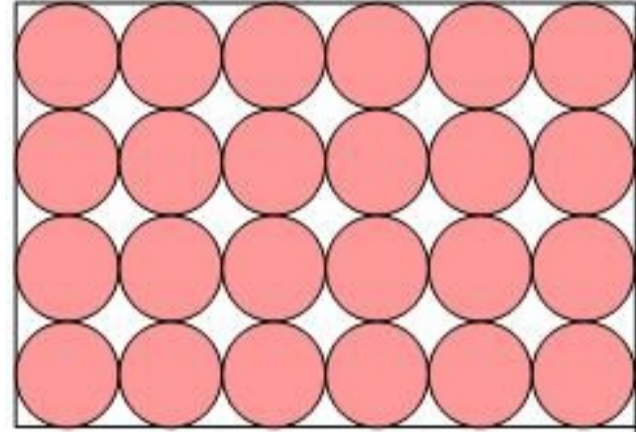
Cultura de células

C6 mantidas em DMEM 5%



doxazosina nas concentrações de 30µM a 180µM

Tempo de tratamento de 48hs



Cultura Organotípica

- Hipocampo de ratos Wistar machos de 6-8 dias;
- Cultivado em membrana Millicell®, durante 14 dias em MEM 20% de SFE;
- No 14º dia é adicionado a doxazosina nas concentrações de 75µM a 250µM;
- Após 48hs é adicionado o IP e as fatias foram fotografadas.



Avaliação da morte celular

Ensaio de caspase 3/7

- A atividade da enzima foi medida através de ensaio fluorimétrico com o substrato Ac-DEVD AFC;
- A clivagem do substrato foi monitorada durante 40 min à 37°C (excitação 390nm/ emissão 520nm).

LDH

- Meio de cultura foi recolhido;
- Reação enzimática colorimétrica;
- Agitação por 5 min (100µM);
- Incubação por 30 min à 25° C
- Absorbância foi medida em 490 nm.

Anexina V/ Iodeto de Propídeo

- As células apoptóticas/necróticas foram identificadas através do kit de anexina V-FITC- Iodeto de Propídeo (Millipore®);

Análise de Citotoxicidade

Iodeto de Propídeo

- Adição de 5µM de PI;
- Visualização em microscópio invertido de luz UV;
- Captura das imagens.

RESULTADOS

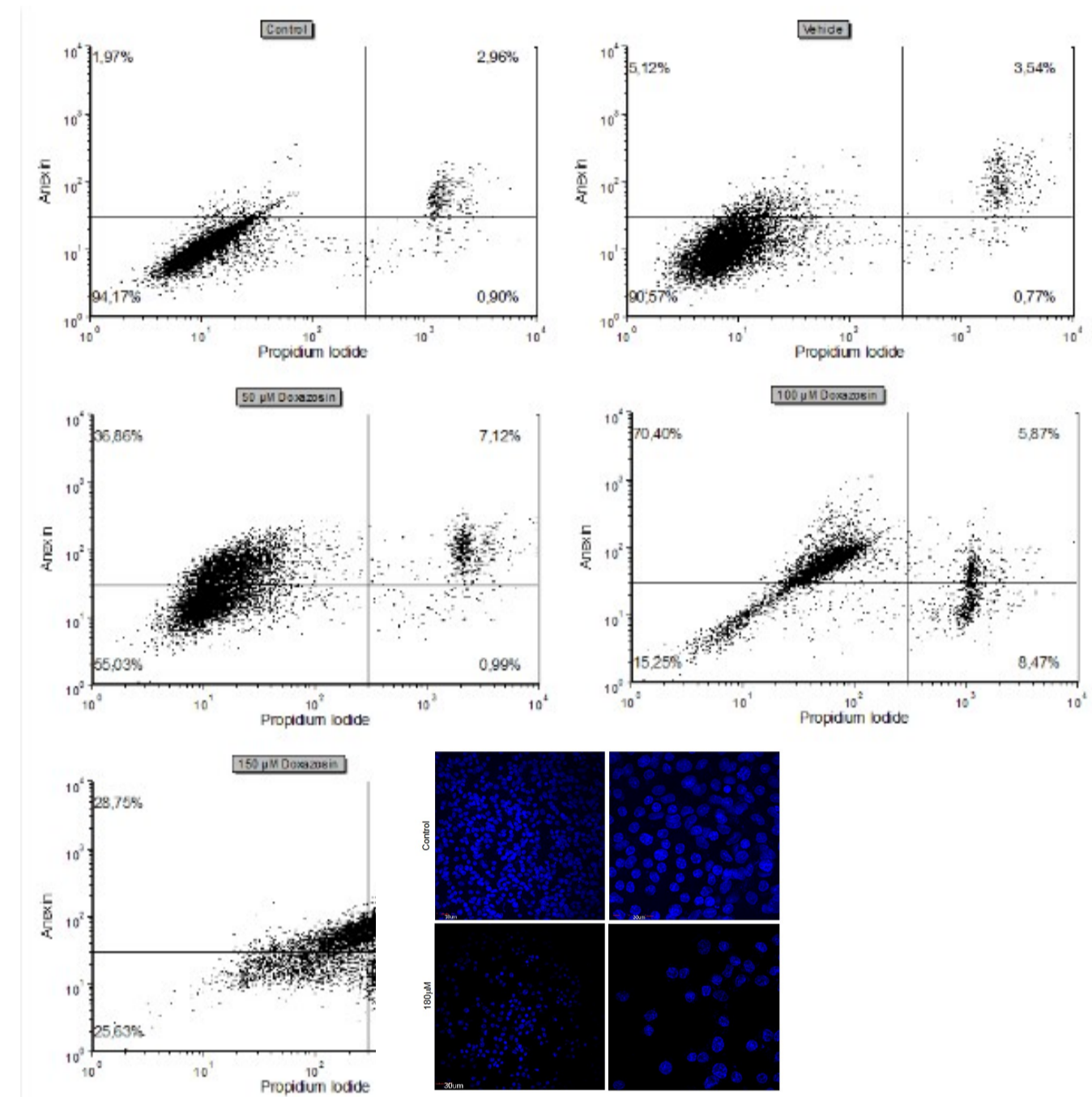


Figura 1. Citometria de fluxo com coloração de Anexina V/ Iodeto de Propídeo, após tratamento de 48hs com Doxazosina. Fotomicrografia confocal de núcleos apoptóticos após o tratamento de 180µM com marcação de Hoechst.

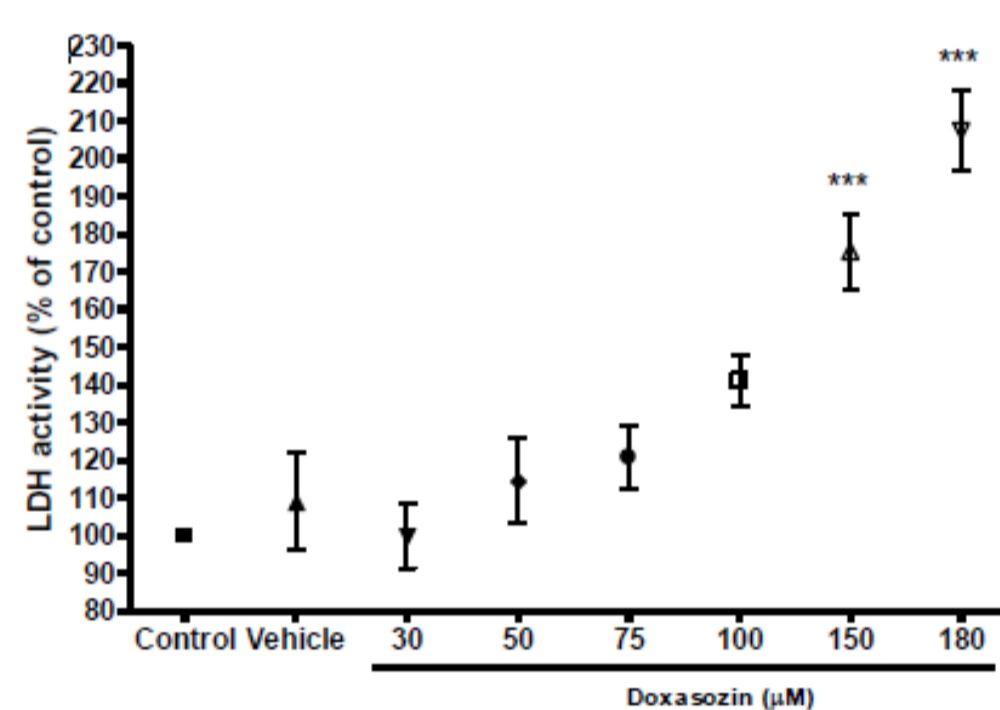


Figura 2. Medida da LDH no meio extracelular após 48hs de tratamento com doxazosina. Médias ± D.P. (n=4), ***p<0,001, ANOVA seguido de Tukey.

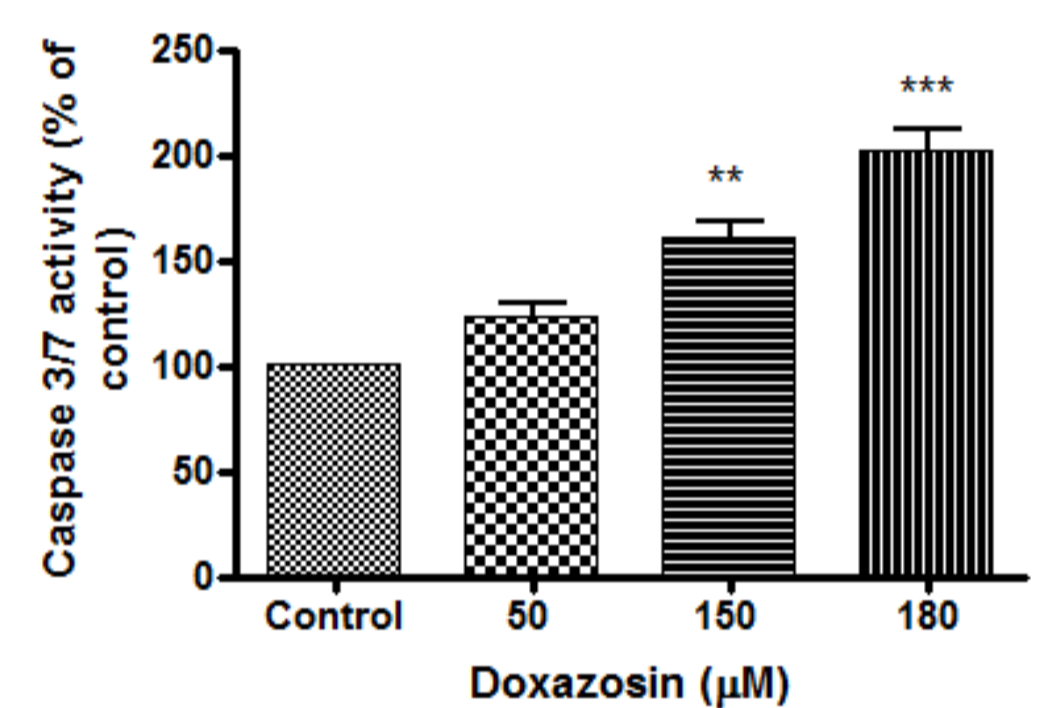


Figura 3. Atividade de caspase 3/7 após tratamento de 48hs com doxazosina. Média ± D.P. (n=4), **p<0,05, ***p<0,001, ANOVA seguido de Tukey.

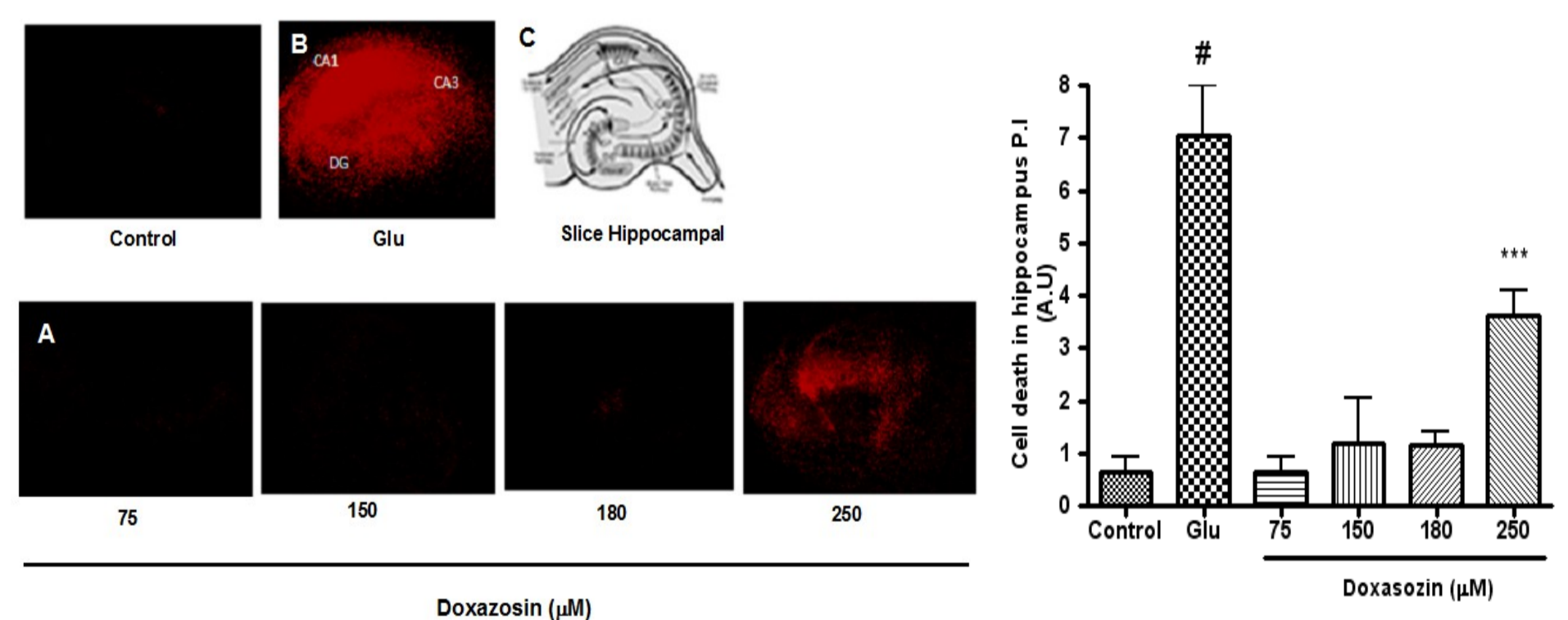


Figura 4. À direita da figura mostra o efeito da doxazosina em cultura organotípica após tratamento de 48hs. Fotomicrografia em luz UV (5µM IP). À esquerda, gráfico da quantificação da coloração do Iodeto de Propídeo. Média ± D.P. (n=6), #p<0,001, ***p<0,001, ANOVA seguido de Tukey.

CONCLUSÃO

A doxazosina induz morte celular por necrose e apoptose nas células de glioma de rato C6;

Não apresentou citotoxicidade na cultura organotípica de hipocampo de ratos nas concentrações utilizadas.



MODALIDADE DE BOLSA

PROBIC FAPERGS- UFRGS

