

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DO
GLICIRRIZINATO DIPOTÁSSIO EM LINHAGENS CELULARES DE
GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

**EVALUATION OF THE CYTOTOXIC AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES
OF DIPOTASSIUM GLYCYRIZINATE IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME CELL
LINES**

Gabriel Alves Bonafé¹, Manoela Marques Ortega^{2*}

¹Acadêmico de Biomedicina da Universidade São Francisco (USF), Bragança Paulista, SP

²Docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade
São Francisco (USF), Bragança Paulista, SP

*Autor correspondente:

Manoela Marques Ortega, PhD

Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Tumores e Compostos Bioativos

Universidade São Francisco

Av. São Francisco de Assis, 218 – Jardim São José

Bragança Paulista, SP, Brasil

CEP: 12916-900

Fone: +55 11 2454 8471

E-mail: manoela.ortega@usf.edu.br

RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) representa 15-20% dos tumores neurológicos sendo considerado pela Organização Mundial da Saúde o mais agressivo. Sua heterogeneidade biológica e resistência a quimioterápicos são os maiores obstáculos para o tratamento efetivo do GBM. O Ácido Glicirrízico (AG) é um composto isolado do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) com efeitos anti-inflamatórios e antitumoral pela inibição da via de sinalização NF- κ B. O glicirrizinato dipotássio (DPG - fórmula química: $C_{42}H_{60}K_2O_{16}$) é um subproduto do AG e também apresenta propriedades anti-inflamatórias, porém sem os mesmos efeitos colaterais. Não há estudos sobre o efeito antitumoral do DPG no GBM. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade e o efeito antiproliferativo do DPG em linhagens celulares de GBM. Para isso, diferentes concentrações do DPG foram testadas nas linhagens celulares U87MG e T98G para determinar seu efeito citotóxico através do ensaio MTT. O efeito antiproliferativo foi avaliado em células tratadas e não tratadas com DPG através do ensaio de exclusão do azul de trypan por 24, 48, 72 e 96h. O Teste T comparou a diferença entre os grupos. Foi observado o efeito citotóxico do DPG pelo ensaio MTT, sendo o IC₅₀ de 18mM e 24mM por 48 horas, para as células U87MG e T98G, respectivamente. As referidas concentrações foram utilizadas para ensaio de proliferação celular. A viabilidade celular evidenciou o efeito antiproliferativo do DPG nas linhagens de GBM ($P < 0,005$). Portanto, o DPG apresenta efeito citotóxico e antiproliferativo nas linhagens celulares estudados, apresentando grande potencial para ser utilizado como medicamento terapêutico no GBM.

Palavras-chave: Glioblastoma multiforme, glicirrizinato dipotássio, efeito citotóxico, efeito antiproliferativo.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) represents 15-20% of neurological malignancies and it is classified as the most aggressive by the World Health Organization (WHO). The tumor muti-clonality and resistance to chemotherapy are the biggest obstacles to effective treatment of GBM. Glycyrrhizic Acid (GA) is an isolated compound of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) with anti-inflammatory and antitumor effects by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. Glycyrrhizinate dipotassium (DPG - chemical formula: $C_{42}H_{60}K_2O_{16}$) is a by-product of GA and has the same anti-inflammatory properties, but without the side effects. To date, there are no studies on the antitumor effects of DPG in GBM. The objective of this study is to evaluate the cytotoxic and anti-proliferative effects of DPG in GBM cell lines. Therefore, different concentrations of DPG were tested in U87MG and T98G cell lines to determine their cytotoxic effect through the MTT assay. The anti-proliferative effect was evaluated in cells treated and not treated with DPG by the trypan blue exclusion assay for 24, 48, 72 and 96 hours. The T test was applied to compare the difference between the groups. The cytotoxic effect of DPG was observed by the MTT assay, and the IC₅₀ was 18mM and 24mM for 48 hours for U87MG and T98G cells, respectively. These concentrations were used for the proliferation assay. Cell viability showed the anti-proliferative effect of DPG in the GBM cell lines ($P < 0,005$). In this study, we verified the cytotoxic and anti-proliferative effects of DPG in the GBM cell lines, which will present opportunity to further investigate this compound and explore its potential to be implicated in GBM treatment regimes.

Keywords: Glioblastoma multiforme, glycyrrhizinate dipotassium, cytotoxicity effect, anti-proliferative effect.

INTRODUÇÃO

Cerca de 2% de todas as neoplasias são representadas pelos tumores primários do sistema nervoso central (SNC) associados à elevada morbidade e mortalidade¹⁴. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), eles podem ser classificados em de acordo com o tecido e/ou células que eles afetam, como por exemplo os tumores de tecido neuroepitelial (astrocísticos, oligodendrogliais e gliomas mistos), tumores ependimários, tumores do plexo coróide, tumores do parênquima pineal, tumores embrionários, tumores meníngeos, linfoma primário, tumores de células germinativas e tumores da região selar⁹. Os gliomas são o tumor primário mais frequente, sendo responsáveis por aproximadamente 30% de todos os tumores do SNC e por 80% dos tumores malignos iniciados no cérebro⁵. Nos Estados Unidos da América são diagnosticados 18 mil novos casos de gliomas anualmente, dentre os quais se observa uma taxa de mortalidade de cerca de 13 mil por ano⁸. No Brasil, o glioma é o mais comum dos tumores que afetam o SNC, sendo que em cada dez pacientes, sete são diagnosticados em sua forma mais agressiva¹⁵.

A OMS classifica os gliomas em quatro graus de malignidades baseando-se na presença de células atípicas, mitoses, proliferação endotelial e necrose. Os tumores que não apresentam nenhuma destas características são classificados em grau I, representando lesões com baixo potencial proliferativo e com a possibilidade de cura após a ressecção cirúrgica. Os gliomas que apresentam só uma dessas características, geralmente células atípicas, são classificados em grau II. Estes são frequentemente de natureza infiltrativa e, embora com baixa capacidade proliferativa, muitas vezes recorrem, tendendo a progredir para graus de malignidade superiores. Os tumores de grau III são lesões com evidência histológica de malignidade, com atipia nuclear e maior atividade mitótica. Os tumores grau IV, também conhecidos como glioblastoma multiforme (GBM), correspondem a neoplasias citologicamente malignas e mitoticamente ativas, com tendência para necrose e/ou proliferação vascular, estando associadas a doenças pré e pós-operatórias de evolução muito rápida geralmente associados a óbitos^{11,14}. O GBM representa 15% dos tumores de cérebro e 65-75% dos astrocitomas⁵.

A incidência do GBM é maior em homens, principalmente em adultos entre 45-70 anos, cuja sobrevida média após o diagnóstico é de 17 semanas sem tratamento⁹. Atualmente, o tratamento consiste em cirurgia com remoção do tumor seguida da associação de

radioterapia e quimioterapia com temozolamida (TMZ)⁴. Apesar do tratamento agressivo, a sobrevida média ainda é desfavorável, inferior a 15 meses, não havendo tratamentos alternativos eficazes¹⁹.

O alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) (Figura 1A), especificamente sua raiz, é amplamente utilizado na medicina popular chinesa por sua ação farmacológica anti-histamínica, antibiótica e anti-inflamatória, além de apresentar ação antitumoral¹⁷. O Ácido Glicirrízico (AG) (fórmula química: C₄₂H₆₂O₁₆) é um composto isolado do alcaçuz, o qual tem sido bastante utilizado, principalmente por seus efeitos anti-inflamatórios, porém apresenta alguns efeitos colaterais como eritema, hipersudorese ou reações alérgicas na pele^{17, 3}. O Glicirrizinato dipotássio (DPG) (fórmula química: C₄₂H₆₀K₂O₁₆) (Figura 2B) por sua vez, é um subproduto do AG com ação semelhante aos corticóides quanto às suas propriedades anti-inflamatórias e antialérgicas, porém sem apresentar os mesmos efeitos colaterais, podendo ser usado continuamente. O DPG já é utilizado na indústria farmacêutica e cosmética por apresentar essas propriedades¹.

A.



B.

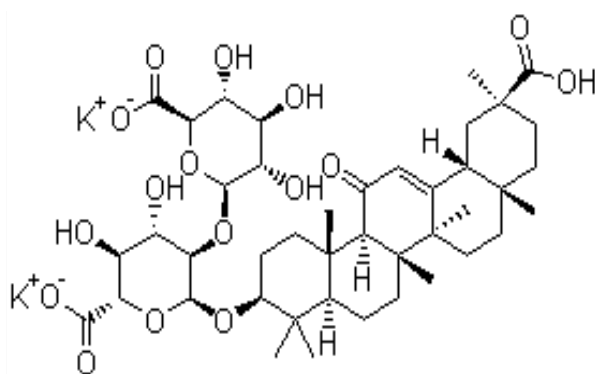


Figura 1. A. Alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) B. DPG em sua estrutura molecular. Fonte: <http://portalvegetal.com/wp-content/uploads/2013/03/alcacuz2.jpg>; http://www.in-cosmeticskorea.com/__novadocuments/202165?v=635883612926800000 - Acesso em 10/11/2017.

Sabe-se que o AG foi capaz de suprimir a expressão proteica de Ki-67, NF-κB, p65, Cox2, iNos e Vegf e aumentar a expressão da proteína p53, connexin-43, caspase-9 e caspase-3 clivada^{10, 13, 16, 20}. Entretanto, os mecanismos pelos quais o DPG regula vias de sinalização importantes, como a NF-κB ainda não foi elucidado. Conforme o exposto, será verificado em modelos experimentais *in vitro* o efeito antitumoral do DPG, frente ao seu potencial citotóxico e antiproliferativo, como alvo terapêutico para o GBM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem Celulares

As linhagens celulares de GBM, U87MG e T98G, foram gentilmente doadas pela Dra. Carmen Silva Passos Lima, Laboratório de Genética do Câncer, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo. Todas as linhagens acima citadas foram descongeladas três dias antes do experimento e mantida em meio de cultura DMEM enriquecido com glicose (Cultilab®, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®, Brasil), 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab®, Brasil). Os frascos de cultura foram mantidos em estufa a 37°C, 5% de CO₂.

Ensaio MTT

O ensaio pelo método [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio] ou MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade. O DPG (gentilmente doado pela Profa. Dra. Thalita Rocha, Laboratório de Farmacologia Geral e Clínica, Universidade São Francisco - USF, Bragança Paulista, SP) foi utilizado em diferentes concentrações (U87MG: 2mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 12 mM, 15 mM, 18 mM, 20 mM e 24 Mm; T98G: 8mM, 12mM, 15mM, 18mM, 20mM, 24mM, 28mM e 32mM) por 24, 48 e 72 horas de tratamento. Uma triplicata apenas de células e meio de cultura foi utilizada como controle. Em placas de cultura com 96-poços foram plaqueadas cerca de $0,2 \times 10^6$ células, incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas, e tratadas com as diferentes concentrações de DPG. Após os períodos propostos acima, foi adicionado ao meio 20µL (2µg/µL) de MTT (Sigma, Estados Unidos). As células foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C, 5% de CO₂. Em seguida, 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Brasil) foi adicionado em cada poço e após 15 minutos de incubação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro com absorbância de 540nm (Thermo Fisher, Estados Unidos).

Ensaio de Exclusão pelo Azul de Trypan

O ensaio de proliferação celular foi realizado para verificar o potencial antiproliferativo do DPG. Para cada linhagem celular, foram plaqueadas cerca de $2,4 \times 10^6$ células em placa de cultura com 24-poços e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 24

horas. Após esse período, as células foram tratadas com DPG 18mM para a U87MG e 24mM para a T98G e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 48 horas (IC₅₀ obtidos pelo método de MTT). Uma triplicata apenas de células e meio de cultura foi utilizada como controle. Após 24 horas de tratamento as células foram contadas utilizando azul de Trypan (Sigma, Estados Unidos) e câmara de *Newbauer*, e foram replaqueadas em seguida. O mesmo foi realizado após 48, 72 e 96 horas de tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito citotóxico do DPG

Em estudos anteriores, o AG induziu diferentes graus de apoptose em muitas linhagens celulares de câncer, incluindo hepatoma humano (HLE), leucemia promielocítica (HL-60), câncer de estômago (KATO III) e câncer de próstata (LNCaP), pela fragmentação do DNA e estresse oxidativo em células cancerígenas^{2, 6, 7, 12, 18}. Entretanto, não há estudos sobre o efeito do DPG em linhagens celulares de GBM. Desta forma, foi testado diferentes concentrações do DPG em diferentes tempos de tratamento, no qual foi observado um acentuado efeito citotóxico do DPG nas concentrações de 15mM, 18mM e 20mM por 48h e 72h para as células U87MG e de 20mM, 24mM e 28mM por 48h e 72h para as células T98G, sendo adotados como IC₅₀ (melhor concentração e tempo de tratamento definidos,) de 18mM e 24mM por 48 horas, para as células U87MG e T98G, respectivamente (Figura 2A e 2B). As referidas concentrações foram utilizadas para o outro método proposto.

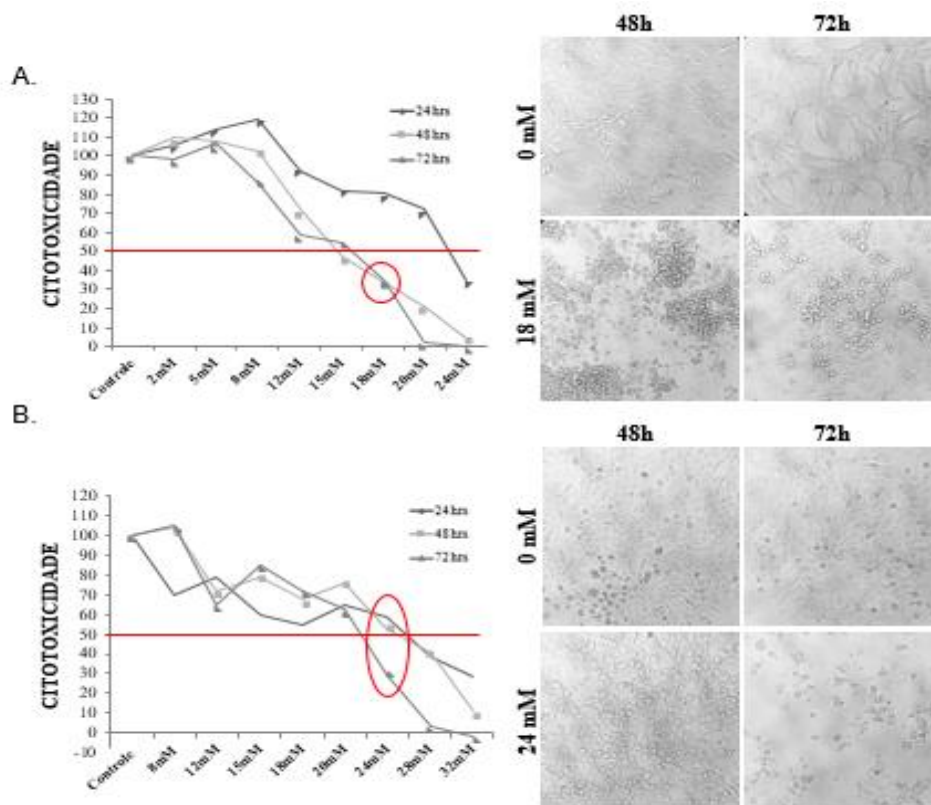


Figura 2. Citotoxicidade do DPG nas linhagens celulares de GBM. Gráfico representando a citotoxicidade das linhagens celulares U87MG (A) e T98G (B) após tratamento com DPG pelo ensaio MTT. Cada ponto representa a média da triplicata. Fotos obtidas com o aumento de 20X.

Efeito antiproliferativo do DPG

Foi observado efeito antiproliferativo do DPG nas linhagens celulares de GBM estudadas (Figuras 3A e B). Não há estudos anteriores demonstrando o efeito antiproliferativo do AG ou DPG em células tumorais e em linhagens celulares de GBM.

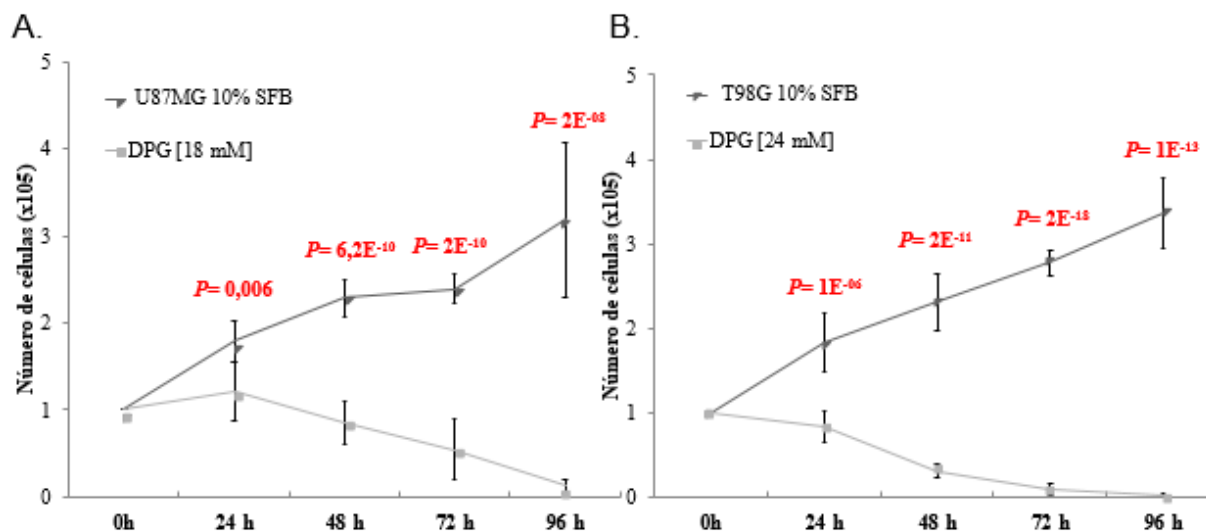


Figura 3. Efeito antiproliferativo do DPG nas linhagens celulares de GBM. Gráfico representando a viabilidade celular da U87MG (A) e T98G (B) após tratamento com DPG pelo ensaio de exclusão do azul de trypan. Cada ponto representa a média das triplicatas. $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

CONCLUSÕES

Os resultados, em nosso melhor conhecimento, estão sendo apresentados pela primeira vez no GBM. Além disso, concluímos que o DPG apresenta grande potencial para ser utilizado como medicamento terapêutico no GBM. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para averiguar melhor este potencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CEC EDITORE. Dipotássio glicirrizinato: antinfiammatorio per pellisensibili da Maruzen Pharmaceuticals-Prodotti Gianni, 2013. Disponível em: <<http://cec-editore.com/component/k2/25-dipotassio-glicirrizinato/25-dipotassio-glicirrizinato>>. Acesso em: 17/10/2017.
2. Curreli, F; Friedman-Kien, AE; Flore, O. Glycyrrhizic acid alters Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency, triggering p53-mediated apoptosis in transformed B-lymphocytes. *J Clin Invest* 115: 642-652, 2005.
3. Feltrin, AC. Estudo comparativo de Glycyrrhiza glabra (Alcaçuz) e periandradulcis (Alcaçuz-da-terra). 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
4. Glioblastoma. Instituto Oncoguia, 2008. Web. Acesso em: 29/10/2017.
5. Goodenberger, ML; Jenkins, RB. Genetics of adults glioma, *Cancer Genetics*, Elsevier, December 2012.
6. Hibasami, H; Iwase, H; Yoshioka, K; Takahashi, H. Glycyrrhetic acid (a metabolic substance and aglycon of glycyrrhizin) induces apoptosis in human hepatoma, promyelotic leukemia and stomach cancer cells. *Int J Mol Med* 17: 215-219, 2006.
7. Hibasami, H; Iwase, H; Yoshioka, K; Takahashi, H. Glycyrrhizin induces apoptosis in human stomach cancer KATO III and human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Int J Mol Med* 16: 233-236, 2005.
8. Kantelhardt, SR; Caarls, W; de Vries, AH; Hagen, GM; Jovin, TM; Schulz-Schaeffer, W; Rohde, V; Giese, A; Arndt-Jovin, DJ. Specific visualization of glioma cells in living low-grade tumor tissue. *Plos one* 5(6): e11323, 2010.
9. Karak, AK; Singh, R; Tandon, PN; Sarkar, CA. Comparative survival evaluation and assessment of interclassification concordance in adult supratentorial astrocytic tumors. *Pathol Oncol Res* 6(1): 46-52, 2000.
10. Khan, R; Khan, AB; Lateef, A; Rehman, MU; Tahir, M; Ali, F; Hamiza, OO; Sultana, S. Glycyrrhizic Acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of wistar rats. *Plos one* 8(2):e56020, 2013.
11. Lucena, RCG; Mello, RJV; Junior, JRL; Cavalcante, GM; Ribeiro, M. Correlação clínico-topográfica em glioblastomas multiformes nas síndromes motoras: significados fisiopatológicos. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* São Paulo, v. 64, n. 2b, p. 441-445, June 2006.
12. Luo, H; Zhang, Z; Wu, Q; Huang, M; Huang, W; Zhang, D; Yang, F. 18B-glycyrrhetic acid-induced apoptosis and relation with intracellular Ca²⁺ release in human breast carcinoma cells. *Chin Ger J Clin Oncol* 3: 137-140, 2004.
13. Manns, MP; Wedemeyer, H; Singer, A; Khomutjanskaja, N; Dienes, HP; Roskams, T; Goldin, R; Hehnke, U; Inoue, H. Glycyrrhizin in patients who failed previous interferon alpha-based therapies: biochemical and histological effects after 52 weeks. *J Viral Hepatitis* 19(8): 537-546, 2012.
14. Moreira, JB. Astrocitomas Difusos de Baixo Grau. FMUP, Porto, Portugal, Abril de 2011.
15. Next Frontiers to Cure Cancer - Integrating Science and Patient Care. AC Camargo Cancer Center, Junho de 2013. Web. Acesso em: 29/10/2017.
16. Schrofelbauer, B; Raffetseder, J; Hauner, M; Wolkerstorfer, A; Ernestt, W; Szolar, OHJ. Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates proinflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signalling. *Biochem J* 421(3): 473-482, 2009.

17. Shibata, N; Shimokawa, T; Jiang, Z; Jeong, Y; Ohno, T; Kimura, G; Yoshikawa, Y; Koga, K; Murakami, M; Takada, K. Characteristics of intestinal absorption and disposition of glycyrrhizin in mice. *Bio Drug Disposition* 215-101, 2000.
18. Sivasakthivel, T; Xu, L; Ramaswamy, K; Gnanasekar, M. Glycyrrhizin induces apoptosis in prostate cancer cell lines du-145 and Incap. *Oncology Reports* 20: 1387-1392, 2008.
19. Stupp, R; Hegi, Me; Mason, WP. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomized phase III study: 5 years analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology* 10: 459-466, 2009.
20. Yang, KW; Li, RX; Yang, ZL; Li, PZ; Wang, F; Liu, Y. Novel polyion complex micelles for liver-targeted delivery of diammonium glycyrrhizinate: in vitro and in vivo characterization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 88(1):140- 48, 2009.