

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO FARMACOGENÉTICO E
FARMACOGENÔMICO DO METOTREXATO NA
RESPOSTA CITOTÓXICA DE CÉLULAS
MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DO SANGUE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Barbisan

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**EFEITO FARMACOGENÉTICO E
FARMACOGENÔMICO DO METOTREXATO NA
RESPOSTA CITOTÓXICA DE CÉLULAS
MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DO SANGUE**

por

Fernanda Barbisan

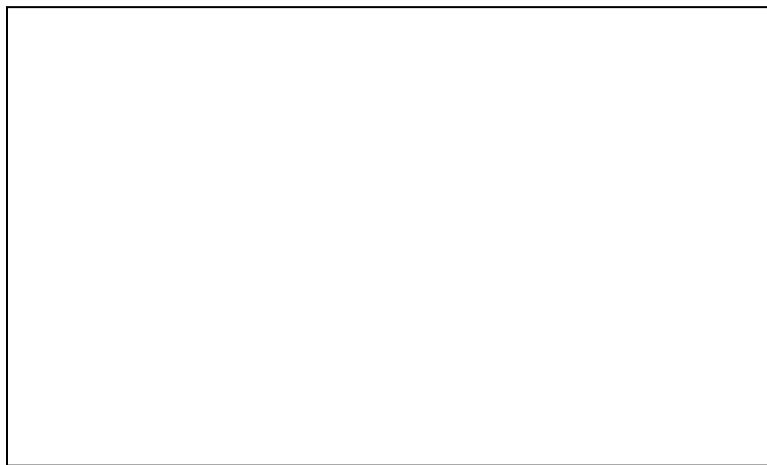
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia dos Processos Oxidativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânicca da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica



Ficha catalográfica elaborada por
Biblioteca Central da UFSM

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Fernanda Barbisan. A reprodução de partes ou
do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Doze, n. 2010, Bairro da Luz, Santa Maria, RS. CEP:97110-680
Fone: (055)5532225678; Fax: (055)5532251144; E-mail: ufesme@ct.ufsm.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Avaliadora, abaixo assinada, Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO FARMACOGENÉTICO E
FARMACOGENÔMICO DO METOTREXATO NA
RESPOSTA CITOTÓXICA DE CÉLULAS
MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DO SANGUE**

elaborada por
Fernanda Barbisan

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

**Ivana Beatrice Mânic da Cruz, Dr^a. (UFSM)
(Orientadora)**

Maria Izabel Ugalde da Rocha, Dr^a. (UFSM)

Glauber Wagner, Dr. (UNOESC)

Santa Maria, 18 de julho de 2014.

DEDICATÓRIA

A minha família, por ter acreditado e me apoiado,
a minha melhor mãe científica Ivana da Cruz e
ao meu grande amigo Claudinei Ascoli (*in memoriam*),
conseguimos, esta é a nossa dissertação.

AGRADECIMENTOS

Ao ser superior que nos guia e protege pelos caminhos da vida.

Aos meus amados pais, Ione e Vanderlei, e nonos, Hermes e Ana, pelo apoio incondicional, paciência e incentivo. Nós sabemos quantas pedras removemos do caminho para chegarmos até aqui.

As minhas tias, que sempre foram muito mais do que isso, pelo apoio, amor, confiança e motivação incondicional.

A minha irmã Dani e aos meus primos, o amor e a admiração de vocês com certeza foi e é pedra fundamental nesta caminhada. Enfim, família, obrigada por nunca medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos!

Ao meu querido Claudinei (*in memoriam*), obrigada por ainda criança termos feito o pacto do doutorado, por ter sido fundamental na minha vinda a Santa Maria e por estar sempre ao meu lado. Sinto teu incentivo nos momentos mais difíceis e tua alegria campeira quando tudo dá certo. Amigo, aqui está a nossa dissertação.

Aos professores Marco Aurélio Echart Montano e Glauber Wagner por acreditarem no meu sonho e me propiciarem chegar até o Laboratório, conhecer a Professora Ivana e entrar no maravilhoso mundo da Pesquisa.

A professora Ivana, por acreditar que eu era capaz quando até mesmo eu duvidava, chegando sem me conhecer e sem as noções mínimas de Pesquisa. Você abriu-me as portas como uma mãe abre os braços para receber um filho. Só tenho a agradecer, agradecer e agradecer por seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência. Você é um ser humano e uma profissional ímpar, minha grande inspiração em tudo que faço e pretendo fazer.

As minhas lindas e queridas amigas Elis, Kênia, Andri, Caci, Marcelle, Xanda e Lidi, mesmo de longe o apoio e o estímulo de vocês foi e é fundamental.

A Thaís Algarve, que me ensinou o be-a-ba do laboratório, obrigada pelos muitos ensinamentos, paciência, preocupação e até pelas noites viradas no Laboratório, que foram essenciais.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica: primeiramente a Jéssica, minha querida tua ajuda foi fundamental; a Maiqui que se tornou uma grande amiga, obrigada por todos os socorros

dentro e fora do Laboratório; a Cibele, Rodayne, Felipe e todos os demais ICs, obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Matheus, meu querido e grande amigo pelo apoio incondicional, pelos mates, por todas as nossas conversas, enfim, por ser esse grande parceiro.

Ao Alencar, meu primeiro parceiro de trabalhos, a Verônica por me aguentar praticamente 24 horas por dia. Ao Eduardo Dornelles, a Francine, a Karen, obrigada a todos por estarem sempre dispostos a ajudar, vocês sem dúvida tornaram e tornam mais leve o trabalho. Obrigada por dividirem comigo as angústias e alegrias e por ouvirem minhas bobagens. Foi e é muito bom poder contar com vocês no Lab e na vida!

A todos os demais colegas do Laboratório Biogenômica, vocês são muito mais que meros colegas, vocês são amigos. Somos uma família, cada um com suas qualidades e defeitos, mas todos com uma essência boa que torna o trabalho agradável e cheio de energia positiva.

Aos doadores de sangue, pela paciência e disponibilidade nas muitas coletas realizadas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e pelos recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

*“É melhor tentar e falhar,
que se preocupar e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ...”*

Martin Luther King

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO FARMACOGENÉTICO E FARMACOGENÔMICO DO METOTREXATO NA CITOTOXICIDADE DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DO SANGUE

AUTOR: Fernanda Barbisan

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e Local da Apresentação: Santa Maria, 18 de julho de 2014

O Metotrexato (MTX) é um fármaco antimetabólico análogo do ácido fólico, com vasta aplicação clínica, utilizado em doses elevadas no tratamento de neoplasias e em baixas doses para o tratamento de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide e a psoríase. Apesar de efetivo, o MTX possui diversos efeitos colaterais. Assim, o estresse oxidativo parece estar envolvido com a toxicidade causada pelo MTX a diversos órgãos. Apesar do efeito no desequilíbrio do metabolismo oxidativo, a influência de polimorfismos de enzimas antioxidantes sobre a toxicidade ao MTX ainda não é bem estudada. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar se o polimorfismo Ala16Val da enzima antioxidante superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2), que afeta a eficiência detoxificadora da enzima, poderia ter efeito sobre a resposta citotóxica ao MTX. Para tanto, foi realizado um estudo *in vitro* utilizando células mononucleares do sangue periférico (CMSP), obtidas de doadores saudáveis portadores de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD (genótipos = AA, VV e AV). Uma vez obtidas, as CMSPs foram tratadas com MTX nas concentrações de 10 e 100 µM por 24 e 72 horas, sendo posteriormente analisado o efeito sobre a viabilidade, modulação do metabolismo oxidativo-inflamatório e apoptótico. As CMSP-AA, que naturalmente apresentam uma SOD2 30 a 40% mais eficiente do que as CMSP-VV, apresentaram maior resistência ao tratamento com MTX em relação às CMSP-AV/VV. Quanto aos níveis de produção de EROS (espécies reativas de oxigênio) e lipoperoxidação, houve aumento significativo nas células expostas ao MTX independente do genótipo, entretanto, o aumento dos níveis de carbonilação de proteínas foi observado apenas em CMSP-AV/VV. Nas CMSP-AA houve diminuição da atividade da SOD2. Já quanto aos níveis de Glutathione Peroxidase, as CMSP-AA apresentaram uma elevação mais intensa. Os níveis das caspases 3 e 8 foram aumentados nas CMSP expostas ao MTX, mas a modulação desses genes, assim como do Bax e Bcl-2 (genes envolvidos rota apoptótica), foi genótipo-dependente. O MTX foi capaz de elevar os níveis das citocinas inflamatórias e diminuir o nível da citocina antiinflamatória IL-10, independente do genótipo. Os resultados sugerem que o polimorfismo Ala16Val-SOD2 é capaz de modular a resposta citotóxica de CMSP ao MTX.

Palavras Chave: Metotrexato; superóxido; toxicidade; marcadores oxidativos e inflamatórios

ABSTRACT

Master's Dissertation

Post-Graduate Program in Pharmacology

Federal University of Santa Maria

EFEITO FARMACOGENÉTICO E FARMACOGENÔMICO DO METOTREXATO NA CITOTOXICIDADE Á CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DO SANGUE

AUTHOR: Fernanda Barbisan

ADVISOR: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânic da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, 18th july, 2014.

Methotrexate (MTX) is an antimetabolite drug analogue of folic acid with wide clinical application, used in high doses for the treatment of cancer and in low doses for the treatment of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and psoriasis. Although effective, the MTX has several side effects. The oxidative stress seems to be involved with the toxicity caused by the MTX in various organs. Despite the effect on the imbalance of oxidative metabolism, the influence of polymorphisms of antioxidant enzymes on MTX toxicity is not well studied. In this context, the present study aimed to examine whether the Ala16Val polymorphism of the antioxidant enzyme superoxide dismutase manganese dependent (SOD2), which affects the efficiency of the detox enzyme, could have an effect on the cytotoxic response to MTX. For this, an in vitro study using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from healthy donors harboring different genotypes of polymorphism Ala16Val-SOD (= genotypes AA, VV and AV) was performed. Once obtained, PBMCs were treated with MTX at concentrations of 10 and 100 µM for 24 and 72 hours and analyzed for the effect on viability, modulation of the oxidative metabolism-inflammatory and apoptotic. PBMC-AA which have a naturally SOD2 30 to 40% more efficient than the PBMC-VV, showed more resistance to treatment with MTX compared to PBMC-AV/VV assessed. As production levels of EROS and lipid peroxidation significantly increased in cells exposed to MTX, regardless of genotype, however, increased levels of protein carbonylation were observed only in PBMC-AV/VV. The PBMC-AA demonstrated decreased activity of SOD2 and the levels of glutathione peroxidase with PBMC-AA were higher. The levels of caspase-8 and -3 were increased in PBMC exposed to MTX, but the modulation of these genes, as well as Bax and Bcl-2 genes involved in apoptotic route, was genotype dependent. The MTX was able to raise the levels of inflammatory cytokines and decrease the level of anti-inflammatory cytokine IL-10, regardless of genotype. The results suggest that Ala16Val-SOD2 polymorphism is capable of modulating the cytotoxic response of PBMC to the MTX.

Key words: Methotrexate; superoxide; toxicity; oxidative and inflammatory markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-Sistema antioxidante endógeno.....	26
FIGURA 2- Potencial associação entre o genótipo AA do polimorfismo Ala16Val-SOD2 com a produção de níveis elevados de hidroxila.....	29
FIGURA 3- Potencial associação do genótipo VV com maiores níveis de lipoperoxidação que causam danos as membranas plasmática e a organelas.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA - Alanina Alanina
AICAR-5 - aminoimidazol-4 carboxamida
Ala16Val - Alanina dezesseis Valina
Ala-SOD2 - Alanina-Superóxido Dismutase dois
AMPc - Adenosina monofosfato cíclico
ATP - Adenosina trifosfato
AV - Alanina Valina
Bax - Associado à proteína X
Bcl2 - Célula-B de linfoma dois
bp - Par de base
CAT - Catalase
cDNA - DNA complementar
Casp 3 - Caspase três
Casp 8 - Caspase oito
CMSP - Células Mononucleares do Sangue Periférico
DAMPA - Ácido 4-amino-4-desoxi-n10 metilpteróico
DCF - 2', 7'- Diclorofluoresceina diacetato
DHFR - Diidrofolato redutase
EROS - Espécie Reativa de Oxigênio
FA - Ácido Fólico
GCT - Alanina
GPX - Glutationa Peroxidase
GSSG - Glutationa Oxidada
GTT - Valina
 H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio
Ig γ - Interferon Gama
IL-1 - Interleucina um
IL-1 β - Interleucina-um beta
IL-6 - Interleucina seis
IL-10 - Interleucina dez
LLA - Leucemia Linfoblástica Aguda
MnSOD - Superóxido Dismutase dependente de manganês
MTHFR - Metilenotetrahidrofolato redutase
MTS - *Mitocondrial Target Sequence*
MTT - 3-[4,5dimetiltiazol 2-yl]-2,5-brometo difeniltetrazolico
MTX - Metotrexato
 $O_2^{\bullet-}$ - Superóxido
 OH^{\bullet} - Hidroxila
ON - Óxido Nítrico
 $ONOO^{\bullet-}$ - Peroxinitrito
RFC-1 - *Reduced Folate Carrier*
RT-qPCR - Transcrição reversa quantitativa em Tempo Real da Reação em Cadeia da Polimerase
SNP - Single nucleotide polymorphism

SOD - Superóxido dismutase

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TYMS - Timidilato Sintetase

UV - Radiação Ultravioleta

Val-SOD2 - Valina-Superóxido Dismutase dois

VV - Valina Valina

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1- E-mail de resposta a submissão do manuscrito do Editor da Revista Plos One.....80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1.Histórico do Metotrexato.....	16
1.2 Metotrexato: farmacocinética e farmacodinâmica.....	17
1.3 Metotrexato: Indicações terapêuticas e mecanismos de ação.....	19
1.4 Toxicidade ao metotrexato.....	21
1.5 Resposta farmacogenética ao metotrexato.....	23
1.6 Potencial efeito farmacogenético do metotrexato associado ao metabolismo oxidativo.....	24
1.6.1 Superóxido Dismutase.....	27
1.6.2 Polimorfismo genético da SOD2	27
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3 RESULTADOS.....	33
4 DISCUSSÃO.....	66
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico do Metotrexato

A molécula 4-amino-N10 metil ácido pteroglutâmico, conhecida como Metotrexato (MTX), é um fármaco antimetabólito análogo ao ácido fólico utilizado em altas doses para o tratamento de leucemias desde a década de 50 (WU et al., 2010). Nesse contexto, esse fármaco em doses baixas é também considerado a primeira escolha terapêutica no tratamento de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide e a psoríase (NEVES et al., 2009).

A descoberta do MTX como fármaco começou em Boston, quando o Dr. Sidney Farber, patologista no Hospital da Criança, estava investigando a etiologia patológica da leucemia infantil. Assim, na década de 30, Farber percebeu que a anemia perniciosa, uma doença autoimune causada pela deficiência de vitamina B-12, que ocasiona a elevação dos níveis de glóbulos vermelhos imaturos na medula óssea, avançava quando os pacientes eram tratados com ácido fólico. A partir dessa observação, inferiu-se que uma dieta pobre em ácido fólico poderia induzir melhora no quadro da leucemia (KAUSHANSKY, 2008).

Depois de muitos anos de estudos, Farber executou um protocolo experimental, no qual após coletar amostras de sangue de crianças com anemia perniciosa e contar as células sanguíneas imaturas, tratou essas crianças com ácido fólico. O resultado foi desastroso, e a doença evoluiu. Sendo assim, fundamentado no fato que o ácido fólico parecia estimular o desenvolvimento da anemia perniciosa por meio do aumento da proliferação celular, Dr. Farber solicitou ao colega Dr. SubbaRow, então diretor da divisão de pesquisa do Lederle Labs, para que o mesmo sintetizasse uma molécula antifolato, a qual teria potencial efeito antiproliferativo. A molécula sintetizada foi então utilizada pelo Dr. Farber no tratamento de um pequeno grupo de crianças leucêmicas, uma vez que o princípio da anemia perniciosa (acúmulo de glóbulos vermelhos imaturos) e da leucemia (acúmulo de glóbulos brancos imaturos) é bastante semelhante. O resultado foi impressionante, já que o novo fármaco antifolato produziu a remissão temporária da leucemia. Dessa forma, Dr. Farber relatou suas descobertas em 03 de junho de

1948 em uma publicação no *New England Journal of Medicine*. Em 1950, esse pesquisador fundou em Boston o primeiro Centro de Pesquisa do Câncer no mundo. Em decorrência dos seus estudos, em 1953, o fármaco antifolato denominado Metotrexato foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) no tratamento oncológico (KAUSHANSKY, 2008).

Em 1951, o grupo de pesquisa de Jane C. Wright foi o primeiro a realizar estudos utilizando o MTX no tratamento de câncer de mama, com remissão dos tumores. Em 1956, Min Chiu Li e colaboradores demonstraram remissão completa em mulheres com coriocarcinoma tratadas com MTX (WRIGHT et al., 1951; LI et al., 1956).

Tendo em vista a sua capacidade antiproliferativa, investigações adicionais foram conduzidas com a perspectiva de averiguar o potencial uso terapêutico do MTX em outras doenças. Em 1951, Gubner e colaboradores descreveram, pela primeira vez, o sucesso terapêutico do uso do MTX em seis pacientes com artrite reumatoide e psoríase. Porém, até 1980 poucos estudos foram publicados sobre pesquisas relacionadas ao efeito do MTX no tratamento de doenças autoimunes. Isso se deve principalmente porque, até então, tais doenças eram preferencialmente tratadas com potentes corticoesteróides, que não apresentavam os efeitos colaterais tóxicos conhecidos do MTX. Todavia, a partir de 1980 vários ensaios clínicos foram conduzidos e demonstraram a eficácia do MTX no tratamento da artrite reumatoide e psoríase. Atualmente, o MTX é um fármaco consagrado como agente imunossupressor dessas doenças (NEVES et al., 2009).

1.2 Metotrexato: farmacocinética e farmacodinâmica

O MTX é um fármaco que pode ser administrado por via oral, intravenosa, intramuscular ou intratecal. Em adultos, quando administrado por via oral, a absorção ocorre principalmente na porção proximal do jejuno e parece ser dose-dependente. Geralmente o MTX é bem absorvido, com biodisponibilidade de 60% do fármaco. Todavia, doses acima de $80\text{mg}/\text{m}^2$ não são bem absorvidas devido à saturação do transportador de folato reduzido (*reduced folate carrier* - RFC 1) - envolvido no processo. Os picos séricos são atingidos após uma a duas horas da administração, sendo a meia-vida sérica do MTX de três a dez horas para pacientes recebendo doses de até $30\text{ mg}/\text{m}^2$, e de oito a quinze horas para pacientes em que são administradas doses

maiores. As concentrações eritrocitárias são estáveis por até nove dias após a administração. (BORCHERS et al., 2004; PUIG, 2012).

Após absorção, o MTX é metabolizado pelo fígado em nível intracelular dando origem a três principais metabólitos: ácido 4-amino-4-desoxi-N10-metilpteróico (DAMPA), 7-hidroximetotrexato (7-OH-MTX) e MTX-poliglutamato. O DAMPA é produzido por bactérias intestinais durante a circulação êntero-hepática e apresenta atividade citotóxica até 200 vezes menor que o MTX. Cerca de 10% do MTX é convertido a 7-OH-MTX, um metabólito de solubilidade baixa, que por esse motivo é considerado um dos principais responsáveis pela nefrotoxicidade do MTX (LELES, 2008).

Considerando os principais metabólitos do MTX, os poliglutamatos podem ser retidos nos tecidos pela formação de cadeias de poliglutamatos e, desse modo, contribuírem para a ação farmacológica ou tóxica as células até 48 horas após a exposição ao MTX (LELES, 2008). As maiores concentrações de poliglutamatos localizam-se nos rins, fígado, vesícula biliar, baço, pele e eritrócitos (NUNES et al., 2009) O MTX também tende a se acumular no compartimento extravascular e, por isso, pacientes com derrame pleural, ascite e edema devem ter atenção especial, devido ao risco de toxicidade. Por esse motivo, idosos e pacientes com danos hepáticos e renais devem ter as doses de administração diminuídas (PUIG, 2012). Quando a administração ocorre por via intramuscular, tem-se o pico de concentrações séricas em 30 a 60 minutos, com biodisponibilidade de 80% do fármaco, enquanto que as vias intratecal ou intravenosa possibilitam a absorção completa do fármaco.

Após absorvido, o MTX liga-se a proteínas plasmáticas, principalmente à albumina. Porém, fármacos a base de sulfonamidas, salicilatos, tetraciclinas, cloranfenicol e fenitoína podem desacoplar o MTX da albumina plasmática e diminuir sua biodisponibilidade. Além disso, o MTX em baixas doses não atravessa a barreira hematoencefálica (BORCHERS et al., 2004; PUIG, 2012).

Em relação a depuração (*clearance*) desse fármaco, a excreção renal por filtração glomerular ou secreção tubular ativa é a primeira via de eliminação (80 a 90%), sendo dependente da dosagem e da via de administração. Com a administração endovenosa, 80% a 90% da dose administrada é excretada sem modificação na urina dentro de 24 horas. Cerca de 10% do MTX é excretado por vias biliares e, nesse caso, acredita-se que ocorra circulação êntero-hepática (NUNES et al., 2009; PUIG, 2012).

A depuração do MTX pode ser alterada por qualquer condição ou medicação que afete a função renal. Assim, a depuração total ocorre em aproximadamente 100 mL/min./m² para pacientes pediátricos, 2,3mL/min./ Kg para pacientes adultos e 1,6 mL/min./Kg para pacientes obesos (LELES, 2008).

O retardo na depuração do MTX é um dos principais fatores responsáveis pela toxicidade desse medicamento. Desse modo, o fármaco leucovorina cálcica, por exemplo, é capaz de retardar a potencial toxicidade do MTX em altas doses ou mesmo a sua toxicidade, por excreção retardada. Assim também, o MTX pode ser eliminado através do leite materno, o que restringe o seu uso no período de amamentação (BORCHERS et al., 2004; NUNES et al., 2009; PUIG, 2012).

1.3 Metotrexato: Indicações terapêuticas e mecanismos de ação

Atualmente o MTX apresenta uma vasta aplicação clínica. Como agente quimioterápico é utilizado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA), coriocarcinoma, tumores trofoblásticos em mulheres, osteosarcoma, linfomas de Burkitt e não-Hodgkin, carcinomas de mama, cabeça, pescoço, ovários e bexiga (RAU et al., 2004; NEVES et al., 2009; OLIVEIRA, 2010). Além de sua atividade antineoplásica, o MTX também tem sido utilizado no tratamento da psoríase (DE EUZEBIO et al, 2014), como imunossupressor após o transplante de órgãos e de medula óssea alogênica (FEAGAN et al., 2000), na dermatomiosite (KASTELER e CALLEN, 1997), na artrite reumatoide (AR) (KRAUSE et al, 2014), na granulomatose de Wegener (SPRINGER et al., 2014) e na doença de Crohn (DESALERMOS et al., 2014).

Seu amplo uso terapêutico é obtido via regulação da dose do MTX utilizada para cada patologia. Nos protocolos como agente antineoplásico são utilizadas altas doses (≤ 50 mg por semana). Nessas concentrações, o MTX atua inibindo competitiva e reversivelmente a diidrofolato redutase (DHFR), uma enzima responsável pela redução do folato ao tetraidrofolato, considerando que afinidade do MTX pela DHFR é 3000 a 10000 vezes superior aos folatos. Dessa forma, com a inibição da enzima DHFR, ocorre um acúmulo de diidrofolato e, consequentemente, a depleção do tetraidrofolato, a forma ativa do ácido fólico que atua como co-fator da timidilato sintetase (TYMS) na transferência de unidades de carbono, sendo esse um

processo essencial para os mecanismos de síntese e reparo do DNA e replicação celular (CHIBBER et al, 2011).

O MTX age na fase S do ciclo celular, quando ocorre a duplicação do DNA e a síntese de histonas. Assim, seu efeito imediato consiste na interrupção abrupta da síntese de DNA. Em consequência, as células não conseguem se duplicar, resultando em morte celular de quaisquer células que estejam nessa fase do ciclo. Desse modo, o quimioterápico afeta tanto as células saudáveis quanto as neoplásicas (MARQUES, 2009).

Em baixas doses (de 5 a 25 mg por semana), o MTX é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de algumas doenças autoimunes. Contudo, ao contrário dos protocolos antineoplásicos, os mecanismos de ação do MTX são menos conhecidos. Sua ação antiinflamatória provavelmente envolve a ação em diversas rotas metabólicas, incluindo as seguintes evidências: o MTX interfere no metabolismo da metionina-homocisteína, mais especificamente na transmetilação da homocisteína em metionina por inibição da enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (NEVES et al., 2009). Essa enzima é dependente de folato, catalisando a conversão da homocisteína em metionina. Como resultado, por um lado há o aumento da concentração de homocisteína e, por outro, há a inibição de síntese de poliaminas. Como as poliaminas são essenciais para diversas funções celulares, como proliferação, diferenciação, síntese proteica e reações imuno-mediadas, sua inibição parece resultar nos efeitos imuno-moduladores do MTX (BYDLOWSKI et al., 1998; CRONSTEIN 2005; NEVES et al., 2009).

Além do efeito inibitório na síntese de poliaminas, a ação antiinflamatória do MTX parece estar relacionada a mecanismos ligados à liberação de adenosina e a efeitos diretos na proliferação das células T (CRONSTEIN 2005). Isso porque os poliglutamatos do MTX são capazes de inibir a enzima 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR), que por sua vez inibe as enzimas adenosina desaminase e adenosina monofosfato desaminase. Essa inibição em cadeia culmina com o aumento dos níveis de adenosina na corrente sanguínea. Por outro lado, o aumento na concentração da adenosina extracelular leva ao aumento da adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Esse aumento desencadeia uma diminuição na quantidade de leucócitos, inibindo assim o acúmulo dessas células. Adicionalmente, ocorre a redução na produção de várias citocinas inflamatórias, principalmente do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1

(IL-1), interferon gama (Ig γ). Também ocorre a inibição de monócitos/macrófagos e células T (TIAN e CRONSTEIN 2007; NEVES et al., 2009, LIMA 2012).

Ademais, recentemente a ação antiinflamatória do MTX em baixas doses tem sido relacionada com a indução de apoptose. Tal indução parece ser um dos principais mecanismos imunodepressores desse fármaco, já que a morte de células imunes reduziria a produção da resposta inflamatória. Por outro lado, também existem evidências que relacionam a indução da apoptose causada pelo MTX com o aumento do estresse oxidativo, por meio do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sobre as quais os linfócitos T demonstram particular suscetibilidade (PHILIPS et al., 2003; HERMANN et al., 2005; NEVES et al., 2009). Philips e colaboradores (2003) postularam que a produção de EROs em um primeiro momento é essencial para a ação antiinflamatória e imunomoduladora do MTX. Nos seus estudos, esses pesquisadores notaram que, na resposta ao estresse oxidativo causado pelo MTX, ocorre uma inibição da taxa de proliferação celular de monócitos e células T. Assim, esses autores propuseram que o MTX e seus metabólitos seriam capazes de aumentar a produção de EROs, diminuindo a progressão da inflamação.

1.4 Toxicidade ao metotrexato

Apesar da eficácia terapêutica, o MTX é um fármaco associado à incidência de efeitos adversos graves tais como: mucosite, conjuntivite, toxicidade ao trato gastrointestinal (náuseas, vômitos, anorexia, estomatite, ulcerações e hemorragias graves) (KALANTZIS et al, 2005), toxicidade pulmonar (JAKUBOVIC et al., 2013), hepatotoxicidade aguda e crônica (LAHARIE, et al. 2008), nefrotoxicidade - considerando que alterações na função renal interferem nos níveis plasmáticos do MTX e predispõem o paciente a maiores riscos de toxicidade sistêmica (XAVIER, 2010) -, além do mais grave dos efeitos, que é a neurotoxicidade, que por sua vez pode se apresentar como:

- i) Aguda: quando ocorre durante ou dentro de horas após a administração do MTX, com sintomas de sonolência, confusão, fadiga e convulsões;
- ii) Subaguda: quando ocorre dias e semanas após a administração, com hemiparesia, convulsões, mielopatia e sintomas algicos em membros inferiores, alterações sensoriais e disfunção da bexiga;

iii) Crônica: quando ocorre após meses ou anos, geralmente associada com leucoencefalopatia - uma doença neurológica que causa alteração estrutural da substância branca cerebral, com danos a mielina - caracterizada por alterações de personalidade, demência progressiva, convulsões focais, tetraparesia espástica e estupor (RUBNITZ et al., 1998; SHUPER et al., 2000; FILLEY E KLEINSCHMIDT, 2001; VEZMAR et al., 2003; VEZMAR et al., 2009).

A causa do aparecimento de efeitos adversos em alguns pacientes não está totalmente elucidada. No entanto, parece envolver um acentuado aumento do estresse oxidativo provocado pelo fármaco (HOWARD et al., 2009; KAGER, 2009; CARON et al., 2009; STENZEL et al., 2010).

Protas e colaboradores (2010) investigaram a associação entre a neurotoxicidade causada pela quimioterapia na LLA e os marcadores de estresse oxidativo no líquor. Os autores observaram um aumento na peroxidação lipídica e uma diminuição na capacidade antioxidante total do líquor ao longo do tratamento, indicando que a neurotoxicidade presente no tratamento padrão de LLA poderia estar relacionada ao estresse oxidativo causado pela quimioterapia.

Em estudo com coelhos, Ayromlou e colaboradores (2011) averiguaram que o tratamento com MTX induz danos oxidativos ao tecido medular, com aumento da peroxidação lipídica e diminuição dos níveis das enzimas superóxido-dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPX). Já Uraz e colaboradores (2008), em um estudo com ratos, postulam que a toxicidade causada ao fígado pelo MTX pode estar relacionada ao estresse oxidativo induzido pelo fármaco, com aumento dos níveis de lipoperoxidação e diminuição da enzima GPX.

Jaohvic e colaboradores (2003) administraram dose única de MTX (20mg/kg) em ratos Wistar e posteriormente analisaram os parâmetros oxidativos no fígado, rim e sangue desses animais em comparação com o grupo controle. Os resultados mostraram que, o grupo tratado apresentou níveis significativamente maiores de lipoperoxidação, e diminuição nos níveis de mieloperoxidase e glutationa oxidada (GSSG).

Mukherjee e colaboradores (2013), em estudo com camundongos albinos Swiss tratados com 20mg/Kg por semana de MTX, observaram indução de apoptose e aumento dos marcadores de estresse oxidativo nos hepatócitos, com aumento significativo na peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, geração de radicais superóxido na mitocôndria e diminuição dos níveis de tióis.

Portanto, esses estudos experimentais corroboram com a hipótese de que o estresse oxidativo está diretamente envolvido com a toxicidade causada pelo MTX.

1.5 Resposta farmacogenética ao metotrexato

Cerca de 7 mil genes humanos apresentam polimorfismos pontuais (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) que podem afetar a eficácia e a segurança da ação metabólica dos fármacos. Essas mutações podem ocorrer em proteínas alvos envolvidas no transporte ou em enzimas metabolizadoras (IVER e RATAIN, 1998). Essas alterações genéticas podem estar relacionadas com as variações de respostas interindividuais, ocasionadas pela interação entre genes e drogas. Essas interações, por sua vez, são estudadas pela farmacogenética, uma área emergente da farmacologia clínica (SHI et al., 2001). Portanto, a farmacogenética é uma área do conhecimento que busca explicações para casos como os dos pacientes tratados com MTX que recebem uma dose padronizada de acordo com a patologia a ser tratada.

Assim, apesar da maioria dos pacientes apresentar resposta terapêutica integral a um dado fármaco, existem pacientes em que esse fármaco pode ser de alta toxicidade, com efeitos adversos graves (NUNES, 2009).

Nesse contexto, estudos farmacogenéticos sugerem que polimorfismos relacionados com a rota de metabolização do MTX podem estar associados a eficácia terapêutica desse fármaco (GHODKE et al., 2008). Esse é o caso dos polimorfismos no transportador RFC1, capaz de induzir diferenças no transporte e consequentemente nos níveis intracelulares de MTX. (RANGANATHAN e MCLEOD, 2006).

Outros estudos também relacionam polimorfismos genéticos em enzimas relacionadas ao metabolismo do MTX, como a enzima MTHFR, e assim com a eficácia terapêutica (RANGANATHAN e MCLEOD, 2006) e com a toxicidade ao MTX (URANO et al., 2002; YANG et al., 2012).

Outra enzima importante na metabolização do MTX é a TYMS, que é chave na síntese de novo de timidilato e, assim, estudos farmacogenéticos têm descrito associação entre polimorfismos genéticos nessa enzima com a resposta terapêutica ao MTX (KUMAGAI et al., 2003; RANGANATHAN e MCLEOD, 2006; SALGADO et al., 2007; RÉGO-PEREZ et al., 2008; LIMA et al., 2012).

Diante do exposto e pela inexistência de indicadores pré-tratamento da resposta do paciente ao MTX, os estudos farmacogenéticos exercem um papel fundamental e promissor para a otimização dos tratamentos com tal fármaco (IVER e RATAIN, 1998; RANGANATHAN, 2008).

1.6 Potencial efeito farmacogenético do metotrexado associado ao metabolismo oxidativo

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizado na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Ao mesmo tempo, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas ao nível intracelular e extracelular, criando então o chamado “paradoxo do oxigênio” (HALLIWELL, 2007).

Essas substâncias tóxicas são chamadas EROs, e sua produção ocorre de maneira contínua e fisiológica. Em níveis basais, cumprem funções biológicas relevantes na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento e sinalização intercelular (HALLIWELL, 2007). A produção de EROS está diretamente relacionada ao consumo de oxigênio e a proporção de mitocôndrias nas células. Assim, acredita-se que 1 a 4% do oxigênio consumido pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria não é completamente reduzido à água ou utilizado para a conversão em ATP (Adenosina Trifosfato). A partir de uma sequência de reações de oxiredução, essas moléculas de oxigênio passam a apresentar desemparelhamento de elétrons, tornando-se EROs (RAHA E ROBINSON, 2000). As EROs também podem ser produzidas pelas oxidases, que são enzimas específicas localizadas na membrana plasmática e podem ser produzidas como resposta a fatores de crescimento e citocinas (BARZILAI et al., 2004). Fatores ambientais como luz ultravioleta, radiação ionizante, agentes químicos, metais pesados e maus hábitos alimentares também podem levar a um aumento excessivo na produção de EROs, resultando em um estado de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007). As principais EROs formadas metabolicamente são: o ânion radical superóxido ($O_2 \cdot^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$) (HALLIWELL, 2007).

Dentre as EROs, o ânion $O_2 \cdot^-$, tem papel destacado por ser continuamente produzido como subproduto da fosforilação oxidativa na mitocôndria. Além disso, pode originar-se a partir

de estímulos externos como a irradiação. Nessa perspectiva, o ânion $O_2^{\cdot-}$ é bioquimicamente produzido a partir da redução de 1 elétron de oxigênio, sendo por isso considerado moderadamente reativo. O $O_2^{\cdot-}$ possui meia-vida de aproximadamente 2-4 μ s (microssegundos), tendo baixíssima capacidade de atravessar as membranas biológicas. Entretanto, pode se difundir por longas distâncias a partir de seu local de produção (THOMAS, 2003; HALLIWELL, 2007). Na presença de H_2O_2 , o $O_2^{\cdot-}$ pode ser precursor de espécies oxidantes mais potentes através da reação de Haber-Weiss, na qual metais de transição como Cobre II e Ferro III catalisam a reação, levando a formação do radical OH^{\cdot} . O ânion $O_2^{\cdot-}$ possui alta afinidade com o óxido nítrico (ON), cuja reação leva a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$). Esta é uma molécula espécie nitrosativa de oxigênio que tem grande afinidade com lipídios, causando assim uma extensa oxidação das membranas celulares. Essa reação é conhecida como lipoperoxidação. Como as membranas celulares são compostas por uma membrana com dupla camada lipídica, processos de lipoperoxidação podem causar danos extensivos as células e suas organelas (HALLIWELL, 2007).

O H_2O_2 é outra EROs de grande relevância biológica. Essa molécula apresenta potencial oxidante indireto, agindo como precursor na formação de outras EROs. Assim, é capaz de difundir-se por distâncias consideráveis e atravessar membranas. No citoplasma, o H_2O_2 pode reagir com íons de Cobre ou Ferro II produzindo outro importante EROs, a OH^{\cdot} , numa reação conhecida como reação de Fenton (HALLIWELL, 2007).

Das EROs conhecidas, o radical OH^{\cdot} é altamente reativo e o que causa maior dano. É capaz de reagir com todos os tipos de macromoléculas, causando danos a proteínas, lipídeos e levando a mutações no DNA. Devido a sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. (HALLIWELL, 2007).

Devido ao fato de as EROs serem moléculas de grande reatividade, conforme já comentado, o organismo possui dois sistemas de defesa antioxidantes: o sistema endógeno, constituído por uma cadeia enzimática (Figura 1), e o sistema exógeno, constituído por moléculas bioativas com atividade antioxidant, obtidas a partir da alimentação (MONTAGNER, 2010).

O sistema endógeno é constituído pela SOD, primeira enzima na linha de defesa contra EROs, capaz de dismutar $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . Essa enzima existe sob três isoformas nos compartimentos celulares: a CuZnSOD (citosólica – SOD1 e extraceular – SOD3) e a MnSOD (exclusivamente

mitocondrial – SOD2). O H₂O₂ por sua vez também pode e precisa ser removido, participando as enzimas catalase (CAT) e GPX (SINHA et al., 2013).

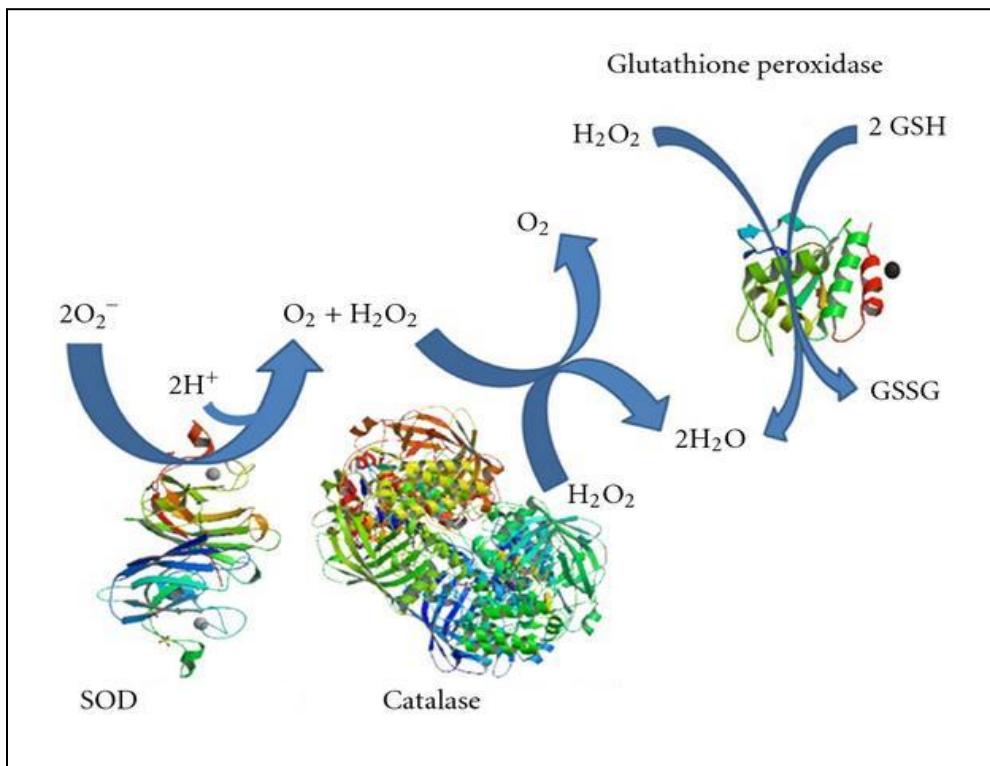


Figura1- Sistema Antioxidante Endógeno, composto pelas enzimas detoxificadora SOD/CAT e GPX.

Fonte: Adaptada de Mello e colaboradores, 2011.

No entanto, quando o acúmulo de EROS ultrapassa a capacidade de defesa antioxidante das células, ocorre o estresse oxidativo. Essa condição decorre do aumento excessivo na produção das EROS, da diminuição da capacidade de defesa celular antioxidantec ou ainda por sinergismo de ambos (COSTA E MORADASFERREIRA, 2001). O estresse oxidativo causado por este desbalanço pode levar a oxidação de lipídeos de membranas, proteínas e DNA, desencadeando eventos patológicos como doenças cardiovasculares, artrite, hipertensão, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, aterosclerose e carcinogênese (LEE et al., 2002; VALKO et al., 2007; MONTAGNER et al.; 2010).

1.6.1 Superóxido Dismutase

As SOD são uma família de enzimas que catalisam a dismutação do ânion $O_2\cdot^-$ em H_2O_2 , que serve de substrato para as próximas enzimas da via antioxidante, como a GPX e CAT, resultando em água e oxigênio. Três isoformas da SOD foram bioquímica e molecularmente caracterizadas em mamíferos até o momento: duas enzimas dependentes do cobre e do zinco como co-fatores (SOD1 e SOD3) e uma enzima dependente do manganês como co-fator: SOD2 ou MnSOD.

Presente em todas as células eucarióticas, a SOD1 é bastante abundante, correspondendo a aproximadamente 1% do total de proteína celular (OKADO-MATSUMOTO e FRIDOVICH, 2001) e se localiza predominantemente no citosol, podendo também ser encontrada no núcleo, peroxissomo e espaço intermembrana da mitocôndria (FRIDOVICH, 1997; OKADO-MATSUMOTO, 2001; STURTZ, 2001). Já a SOD 3 se localiza principalmente em fluidos extracelulares. A SOD-3 é secretada pelas células musculares lisas e macrófagos e se liga a glicosaminoglicanos na matriz extracelular vascular (FUKAI et al., 2002).

A SOD2 é a enzima superóxido dismutase mais relevante por atuar dentro da mitocôndria, na qual ocorre a maior produção de $O_2\cdot^-$ celular, uma molécula homotetramétrica composta por tetrâmeros de aproximadamente 21 kDa por subunidade. Tal enzima é codificada pelo gene SOD2 nuclear, localizada no cromossomo 6 região q25.3. Como essa enzima é sintetizada a partir de um gene nuclear, inicialmente é produzida uma proteína SOD2 inativa que estruturalmente é homotetrâmero, o qual se liga a um íon de manganês por subunidade. Assim, a SOD2 inativa sintetizada no retículo endoplasmático rugoso é enviada para o interior da mitocôndria graças a presença de uma pequena sequência peptídica denominada sequência mitocondrial alvo (*mitochondrial target sequence*, MTS). Ao passar pelos poros da membrana mitocondrial interna, o segmento peptídico MTS é então clivado por lisossomos, e a proteína madura se agrupa em uma forma ativa tornando-se uma enzima funcional (ZELKO et al., 2002; SUTTON et al., 2003).

1.6.2 Polimorfismo genético da SOD2

Ao contrário das outras SODs, a atividade da SOD2 é essencial para a sobrevivência dos mamíferos, como mostrado em uma investigação com camundongos geneticamente modificados

que não possuíam o gene da SOD2 (*Knockout*). Os animais com o gene da SOD2 inativado morreram logo após o nascimento devido ao dano oxidativo exacerbado, além de apresentarem alterações morfológicas importantes, incluindo miocardiopatia dilatada e neurodegeneração (LI et al., 1995).

Por ser um gene vital para a sobrevivência, foi postulado que variações genéticas que afetassem a eficiência da SOD2 poderiam alterar o balanço redox celular e estarem associadas a disfunções e doenças crônico-degenerativas. Desse modo, durante a década de 90, investigações sobre o papel de polimorfismos genéticos na SOD2 em doenças humanas começaram a emergir. Um dos primeiros estudos sugeriu potencial associação entre variações genéticas da SOD2 com diabetes insulino-dependente (POCIOT et al., 1993). Já em 1999, um estudo conduzido por Ambrosone e colaboradores descreveu a associação entre um polimorfismo localizado na região MTS e câncer de mama. Assim, esse SNP (*single nucleotide polymorphism*) envolve a substituição de uma timina (T) por uma citosina (C) no exon 2, nucleotídeo 47. Tal substituição afeta o codon 16, que codifica o aminoácido 9, resultando na substituição do aminoácido valina (GTT) pela alanina (GCT). Por esse motivo, esse polimorfismo pode ser denominado Ala16Val-SOD2 (ZELKO et al., 2002)

Nesse contexto, existem assim dois alelos A (Alanina) e V (Valina), e portanto três possíveis genótipos: AA, AV e VV. Em termos fenotípicos, a variante Ala-SOD2 possui uma estrutura α -hélice, sendo assim facilmente importada para o interior da mitocôndria. Já a variante Val-SOD2 possui uma estrutura parcial de β -lâmina, o que faz com que fique parcialmente retida no poro da membrana interna mitocondrial. A variante Ala/Val-SOD2 apresenta estrutura helicoidal (SUTTON et al., 2003, BAG e BAG, 2008).

Investigações *in vitro* demonstraram que o Ala-SOD2 é capaz de gerar homotetrâmeros SOD2 com 30-40% mais atividade do que a matriz processada com precursor Val-SOD2 (SUTTON et al., 2003; MONTIEL et al., 2013). Apesar da maior eficiência do alelo A, muitos estudos epidemiológicos têm descrito associação entre essa variante genética e o câncer de próstata (TAUFER et al., 2005), mama (BICA et al., 2009), pulmão e estômago (ZEJNLOVIC et al., 2009). Assim, acredita-se que esse fenômeno ocorra devido a maior eficiência da SOD2, que se não for acompanhada por um aumento nos níveis de GPX e CAT, ou de compostos antioxidantes não enzimáticos armazenados na célula, resulta na geração excessiva de H₂O₂. O H₂O₂ pode reagir com metais de transição via reação de Fenton, originando o radical OH[·], que é

o mais lesivo dos radicais e é fortemente mutagênico, sobre o qual o organismo não apresenta mecanismos de defesa (Figura 2).

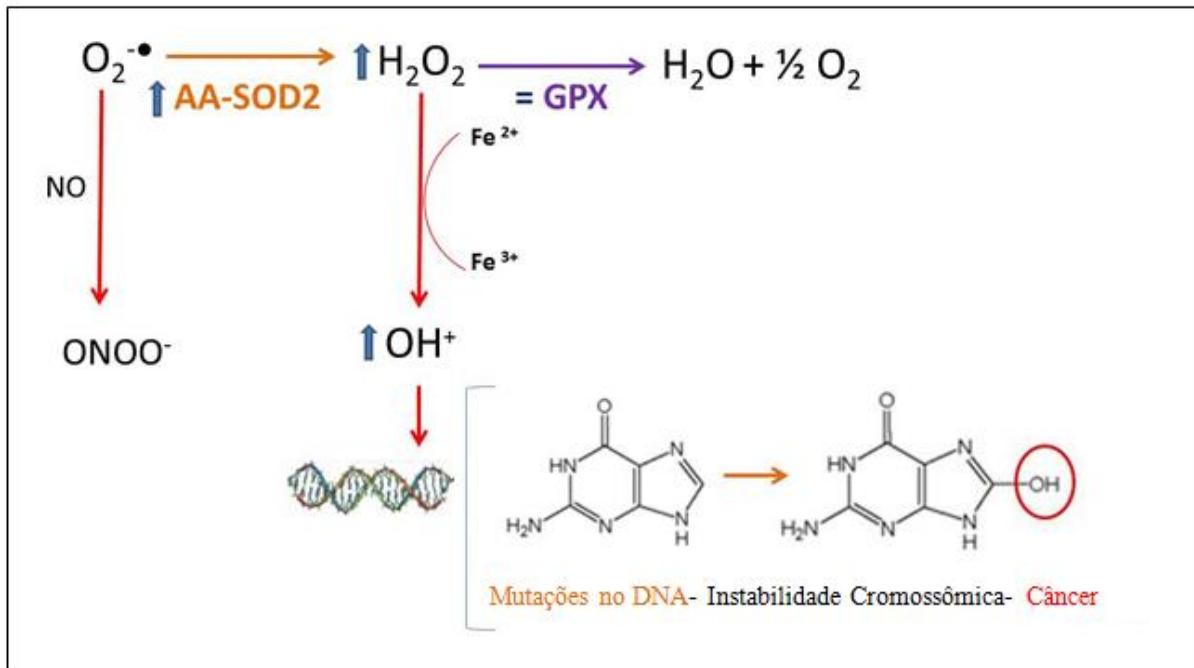


Figura 2- Potencial associação entre o genótipo AA do polimorfismo Ala16Val-SOD2 com a produção de níveis elevados de hidroxila, que estão associados a danos ao DNA e ao risco aumentado de câncer. No caso, a maior taxa de dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , devido a solubilidade do H_2O_2 nas membranas e no citoplasma, pode reagir via reação de Fenton originando altos níveis de OH^{\cdot} .

Fonte: Os Autores

Uma revisão recente sobre a associação entre o polimorfismo Ala16Val-SOD2 e disfunções e morbidades foi conduzida por Bresciani e colaboradores (2013), nesta são citadas evidências de que o genótipo VV, que possui menor eficiência enzimática da SOD2 e, com isso, acúmulo do ânion radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ dentro da mitocôndria, rapidamente reage com o ON formando o ONOO^- . Esta molécula tem grande afinidade com lipídios, causando extensa oxidação das membranas celulares (Figura 3).

Assim, o genótipo VV-SOD2 tem sido associado com disfunção endotelial (KATO, 2000), níveis elevados de LDL-oxidado (GOTTLIEB et al., 2005), complicações microvasculares

do diabetes (TIAN et al., 2011), níveis elevados de citocinas inflamatórias (MONTANO et al., 2012). O genótipo VV-SOD2 também parece estar associado com maior risco de desenvolvimento de obesidade (MONTANO et al., 2009), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010) e maior agressividade tumoral, já que aumenta o potencial de metástase no câncer de mama (BICA et al., 2010).

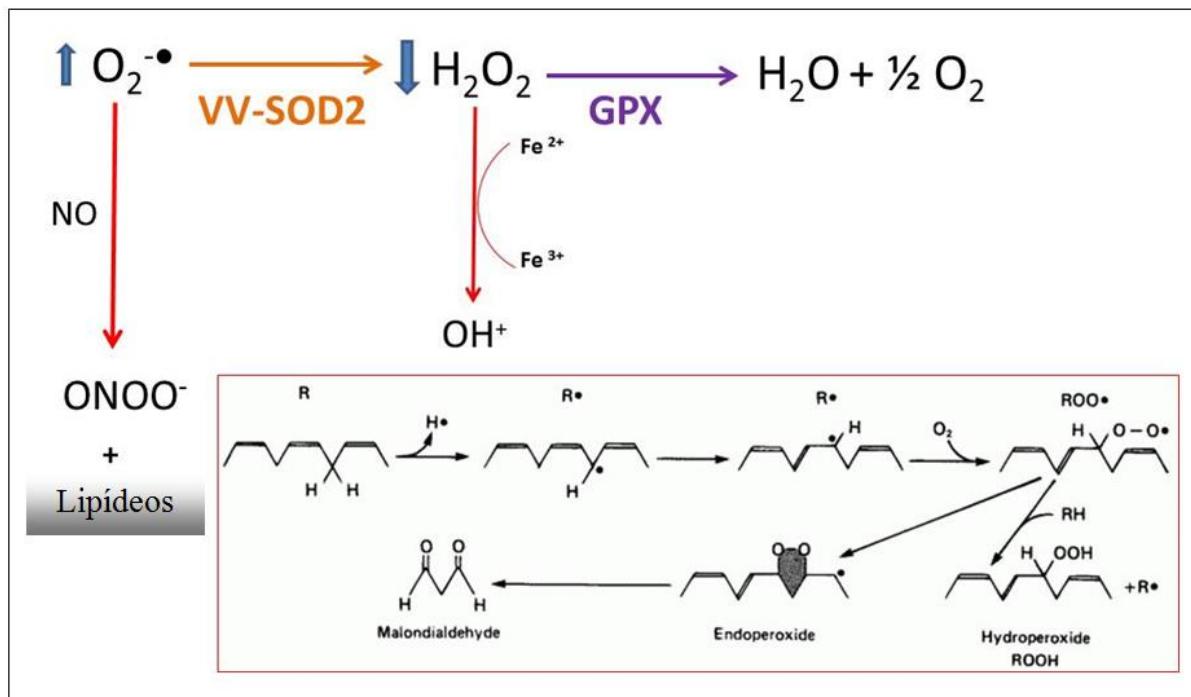


Figura 3- Potencial associação do genótipo VV com maiores níveis de lipoperoxidação que causam danos as membranas plasmática e das organelas. A menor eficiência na taxa de dismutação do $O_2^- \bullet$ em H_2O_2 faz com que haja acumulo de $O_2^- \bullet$ na mitocôndria. Uma vez que virtualmente todas as células produzem ON, e que o $O_2^- \bullet$ possui alta afinidade por esta molécula, a reação entre $O_2^- \bullet$ e ON produz $ONOO^-$ que pode causar extensa lipoperoxidação das membranas.

Fonte: Os autores

Investigações *in vitro* também demonstraram que o polimorfismo Ala16Val-SOD2 afeta diferencialmente a toxicidade de linfócitos expostos a radiação ultravioleta (MONTAGNER et al., 2010), a ação antioxidante do fármaco citrato de clomifeno (COSTA et al., 2012) e também os níveis de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias em linfócitos (MONTANO et al., 2012).

Uma vez que o MTX age diretamente no metabolismo oxidativo das células, e que os efeitos adversos relacionados a esse fármaco apresentam marcada variabilidade inter-pacientes, uma questão em aberto é se o polimorfismo Ala16Val-SOD2 poderia interferir na resposta citotóxica a esse fármaco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito farmacogenético *in vitro* da exposição ao MTX em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2, investigando a resposta citotóxica, alterações no metabolismo oxidativo-inflamatório, indução da apoptose e a expressão de genes relacionados.

2.2 Objetivos Específicos

Em culturas de CMSPs portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2, avaliar o efeito do MTX na(nos):

- Viabilidade celular;
- Proliferação celular;
- Níveis de indicadores de estresse oxidativo (EROs, lipoperoxidação, carbonilação de proteínas, genotoxicidade);
- Atividade e modulação da expressão de RNA das enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, CAT e GPX;
- Produção de citocinas inflamatórias (IL-1B, IL-6, TNF α , Ig γ) e da citocina antiinflamatória IL-10;
- Indução da apoptose através da análise da modulação da expressão dos genes BAX, Bcl-2 e na produção e modulação dos genes das caspases 3 e 8;

3 RESULTADOS

Os resultados bem como a metodologia utilizada deste estudo estão organizados sob a forma de um manuscrito científico submetido a revista Plos One (fator de impacto 4.24) que se encontra em fase de revisão.

Título: Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism

Autores: Fernanda Barbisan, Jéssica de Rosso Mota, Alexis Trott, Verônica Azzolin, Eduardo Bortoluzzi Dornelles, Matheus Marcon, Thaís Doeler Algarve , Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Clarice Pinheiro Mostardeiro, Taís Unfer, Karen Schoot, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism

Fernanda Barbisan², Jéssica de Rosso Mota¹, Alexis Trott⁴, Verônica Azzolin²
Eduardo Bortoluzzi Dornelles³, Matheus Marcon¹, Thaís Doeler Algarve³, Marta
Maria Medeiros Frescura Duarte¹, Clarice Pinheiro Mostardeiro¹, Taís Unfer¹,
Karen Schoot³, Ivana Beatrice Mânicia da Cruz^{1,2,3}

1-Biogenomic laboratory- Federal University of Santa Maria, Santa Maria/RS-Brazil

2- Pharmacology graduate program – Federal University of Santa Maria, Santa
Maria/RS-Brazil

3- Biochemical Toxicology graduate program-- Federal University of Santa
Maria, Santa Maria/RS-Brazil

4-Laboratory of Molecular Biology, University of Western Santa Catarina,
UNOESC, Brazil

* Corresponding author: Ivana BM da Cruz, Av. Roraima 1000, Prédio 19,
UFSM, Santa Maria-RS, Brazil. Zip code: 90105900. Phone: 55-55-32208163,
Fax: 55-55-32208139, Email: ibmcruz@hotmail.com

Abstract

Methotrexate (MTX) is a folic acid antagonist used in high doses as an anti-cancer treatment and in low doses for the treatment of some autoimmune diseases. MTX use has been linked to oxidative imbalance, which may cause multi-organ toxicities that can be attenuated by antioxidant supplementation. Despite the oxidative effect of MTX, the influence of antioxidant gene polymorphisms on MTX toxicity is not well studied. Therefore, we analyzed here whether a genetic imbalance of the manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) gene could have some impact on the MTX cytotoxic response. An *in vitro* study using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from carriers with different Ala16Val-SOD2 genotypes (AA, VV and AV) was carried out, and the effect on cell viability and proliferation was analyzed, as well as the effect on oxidative, inflammatory and apoptotic markers. AA-PBMCs that present higher SOD2 efficiencies were more resistance to high MTX doses (10 and 100 µM) than were the VV and AV genotypes. Both lipoperoxidation and ROS levels increased significantly in PBMCs exposed to MTX independent of Ala16Val-SOD2 genotypes, whereas increased protein carbonylation was observed only in PBMCs from V allele carriers. The AA-PBMCs exposed to MTX showed decreasing SOD2 activity, but a concomitant up regulation of the SOD2 gene was observed. A significant increase in glutathione peroxidase (GPX) levels was observed in all PBMCs exposed to MTX. However, this effect was more intense in AA-PBMCs. Caspase-8 and -3 levels were increased in cells exposed to MTX, but the modulation of these genes, as well as that of the Bax and Bcl-2 genes involved in the apoptosis pathway, presented a modulation that was dependent on the SOD2 genotype. MTX at a concentration of 10 µM also increased inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α and Ig γ) and decreased the level of IL-10 anti-inflammatory cytokine, independent of SOD2 genetic background. The results suggest that potential pharmacogenetic effect on the cytotoxic response to MTX due differential redox status of cells carriers different SOD2 genotypes.

Key words

MTX, manganese-dependent superoxide dismutase MnSOD, cytotoxicity, mRNA expression, PBMCs, apoptosis

Introduction

Methotrexate (MTX) is a drug that has been used since the 1950s to treat a broad number of morbidities such as cancer and autoimmune diseases. The basis for its therapeutic efficacy is the inhibition of dihydrofolate reductase (DHFR), a key enzyme in folic acid (FA) metabolism [1]. At low concentrations, MTX has anti-inflammatory and/or immunosuppressive effects [2] related to the induction of lymphocyte apoptosis through oxidative stress and increasing caspase-3 levels [3, 4]. For this reason, it is the first-line therapy for the treatment of moderate to severe psoriasis and psoriatic arthritis all over the world [5].

In contrast, the continued use of MTX has been associated with oxidative imbalance, which may cause multi-organ toxicities, including hepato-, neuro-, lung- and nephrotoxicity and testicular damage [6, 7, 8, 9]. Investigations suggest that oxidative stress caused by MTX involves decreasing in some antioxidant enzymes as glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase and superoxide dismutase, increasing of lipoperoxidation and ROS levels, as well as apoptosis induction [4,10].

Despite the fact that the clinical response to MTX and its adverse effects exhibit marked interpatient variability indicating pharmacogenetic effects [11], the influence of antioxidant gene polymorphisms on MTX efficacy and toxicity is not well studied.

Human beings present genetic polymorphisms in antioxidant enzymes, which have an impact on cell oxidative metabolism and are associated with the risk of chronic diseases, such as the Ala16Val polymorphism in manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD or SOD2) [12]. This single nucleotide polymorphism (SNP) (rs4880) occurs in the target sequence of the SOD2 enzyme, where a valine to alanine substitution causes a SOD2 conformational change

from a α -helix to a β -sheet, compromising the ability to neutralize O₂⁻ radicals. The α -helix SOD2 protein form produced by the A allele is related to a 30–40% increase in enzyme activity, whereas the V allele is related to reduced SOD2 enzyme efficiency [13].

Previous investigations have suggested that the AA genotype increases the susceptibility to develop some cancer types such as breast and prostate cancer, whereas other studies have associated the V allele with a higher risk of developing metabolic diseases such as obesity and hypercholesterolemia [14]. In addition, the toxicogenetic and pharmacogenetic effects of the Ala16Val-SOD2 polymorphism were described to include the *in vitro* influence on the toxic response of human lymphocytes exposed to UV radiation [14] and methylmercury [15]. The differential response of PBMCs to a clomiphene citrate, a gynecological drug with antioxidant activity, was also reported [16]. The investigation performed by Montano et al. [17] also described that the Ala16Val-SOD2 polymorphism could trigger peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to produce different levels of proinflammatory cytokines when exposed to culture medium richest in glucose and/or insulin. In this case, the V allele presented higher levels of proinflammatory cytokines than did the A allele.

Therefore, we analyzed here whether the Ala16Val-SOD2 polymorphism could have some impact on the MTX cytotoxic response via an *in vitro* study using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes.

Therefore, we analyzed the MTX effect at different concentrations on PBMC viability and cell proliferation of PBMCs with different SOD2 genotypes. In addition, effect on redox metabolism, inflammatory and apoptosis was also investigated from evaluation of the levels of reactive oxygen cells (ROS), lipoperoxidation, protein carbonylation, genotoxicity, antioxidant enzymes activities, cytokines production and caspases levels. Modulation of gene expression of

antioxidant enzymes and some molecules involved with apoptosis pathway by MTX exposition was also determined.

Material and Methods

General experimental design

An *in vitro* analysis was performed using human peripheral mononuclear cells (PBMCs) obtained from carriers of different SOD2 genotypes. The present research study was approved by the Ethics Committee of the UFSM (no 23081.015838/2011-10), and all blood cell donors signed a consent form.

Reagents

MTX, thiazolyl blue tetrazolium bromide, 2',7'-dichlorofluorescin diacetate, silver nitrate, and xanthine were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The Quant-iT™ Picogreen® dsDNA Assay Kit was obtained from Life-Technologies (Carlsbad, CA, USA). Reagents for cell culture including RPMI 1640 Medium, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin and amphotericin were obtained from Sigma-Aldrich Reagents for molecular biology were as follows: Phusion Blood Direct PCR Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), Trizol®, Dnase, SYBR® Green Master Mixes (Life-Technologies). The iScript cDNA synthesis kit was obtained from Bio-Rad (Berkeley, CA, USA). Caspase and cytokine immunoassays were performed using Quantikine® Colorimetric kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The equipment used for ARMS-PCR (genotyping) and Q-PCR were Thermocycler (MaxygenII-Axygen, Union City, CA-USA) and StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) instruments. Fluorimetric readings were obtained using a SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

The effects of SOD2 genotype on cell viability, apoptosis induction, oxidative metabolism imbalance, genotoxicity and inflammatory cytokine levels were analyzed. To perform the experiments, we first collected blood samples and genotyped the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism of 120 healthy adult subjects. The SOD2 genotypes frequencies (AA= 22.8%, VV=27.6% and AV=48.7%) were in Hardy-Weinberg equilibrium that was calculated by chi-square goodness-of-fit statistical test. Further, some subjects with similar lifestyle profiles were invited to donate blood again and these samples were used to perform the *in vitro* assays. From this second blood donation, the PBMCs (1×10^5 cells) were obtained and cultured in controlled conditions with and without MTX exposure (0, 0.1, 1, 10, and 100 μM). There are few studies involving MTX effects on PBMCs cells. Therefore we used a broad concentration range based in a previous investigation performed by Sakuma et al [18]. The cell viability was determined, and the effect of MTX on apoptosis, oxidative stress and inflammatory metabolism was evaluated and compared among all treatments. Apoptosis pathway induction by MTX was evaluated by quantifying caspase-8 and -3 levels. Caspase-8 is an apoptosis initiator molecule, which activates caspase-3, and represents a key point in the transmission of the proteolytic signal. The gene expression levels of these caspases were also determined. Because MTX oxidative stress could be related to mitochondrial damage that triggers apoptosis, we also analyzed the effect of MTX treatments on Bcl-2 and BAX gene modulation. These genes belong to the Bcl-2 family of gene proteins that is also involved in the apoptosis pathway. The effect of MTX on PBMC oxidative metabolism was evaluated by quantifying ROS, lipoperoxidation, protein carbonylation and genotoxicity levels. The levels of antioxidant enzymes [SOD1, SOD2, catalase (CAT), and glutathione peroxidase, (GPX)] were also determined, as were the effects of MTX on the gene expression of these enzymes. Because PBMCs produce important inflammatory cytokines modulated by MTX [19], the levels of interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor

necrosis factor alpha (TNF α), interferon gamma (IFN γ) and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) were measured and compared among PBMCs with different Ala16Val-SOD2 genotypes that had been exposed to MTX. The caspase-1 level was also determined because this intracellular cysteine protease is required for processing the IL-1 precursor into the mature and active form that can then be secreted from the cell [20]. All experiments were performed in triplicate, and the assays used to perform these analyses are described below.

Ala16Val-SOD2 SNP genotyping

To obtain PBMCs, the blood samples were first collected by venipuncture from 120 healthy adult subjects (26.4 ± 7.3 years old) living in a Brazilian region (Rio Grande do Sul) without a history of diseases that are treated with MTX, non-smokers, not obese, no use of chronic medication or vitamin supplements, no previous cardiovascular medical history or hypertensive disorder, and no metabolic diseases or other morbidity that could affect the results. The Ala16Val-SOD2 genotyping was determined by polymerase chain reaction using a direct total blood cell sample and Tetra-Primer ARMS-PCR assay as described by Ruiz-Sanz et al. [21] with slight modifications. Briefly, two primer pairs were used to amplify and determined the genotype of a DNA fragment containing the Ala16Val polymorphism in the human SOD2 sequence. The 3'-end of the allele-specific primers is underlined. Underlined lowercase bases indicate the introduced mismatches. The PCR reaction was carried out in a total volume of 40 μ L containing 20–40 ng of genomic DNA as the template, 0.5 μ M of each primer, 100 μ M of each dNTP, 1.25 mM of MgCl₂, PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), and 1.25 Units of DNA polymerase. The PCR amplification was carried out with an initial denaturation at 94°C for 7 minutes, followed by 35 cycles of 60 seconds of denaturation at 94°C, 20 seconds of annealing at 60°C, and 30 seconds of extension at 72°C, and

an additional 7 minutes of extension at 72°C at the end of the final cycle. A 20- μ L aliquot of the PCR products was mixed with 6 μ L of loading buffer and resolved by electrophoresis in a 1.5% agarose gel. This procedure resulted in three bands in heterozygotes (514, 366, and 189 bp) and two bands in homozygotes (Val/Val resulting in bands of 514 and 189 bp, and Ala/Ala resulting in bands of 514 and 366 bp) (Figure 1).

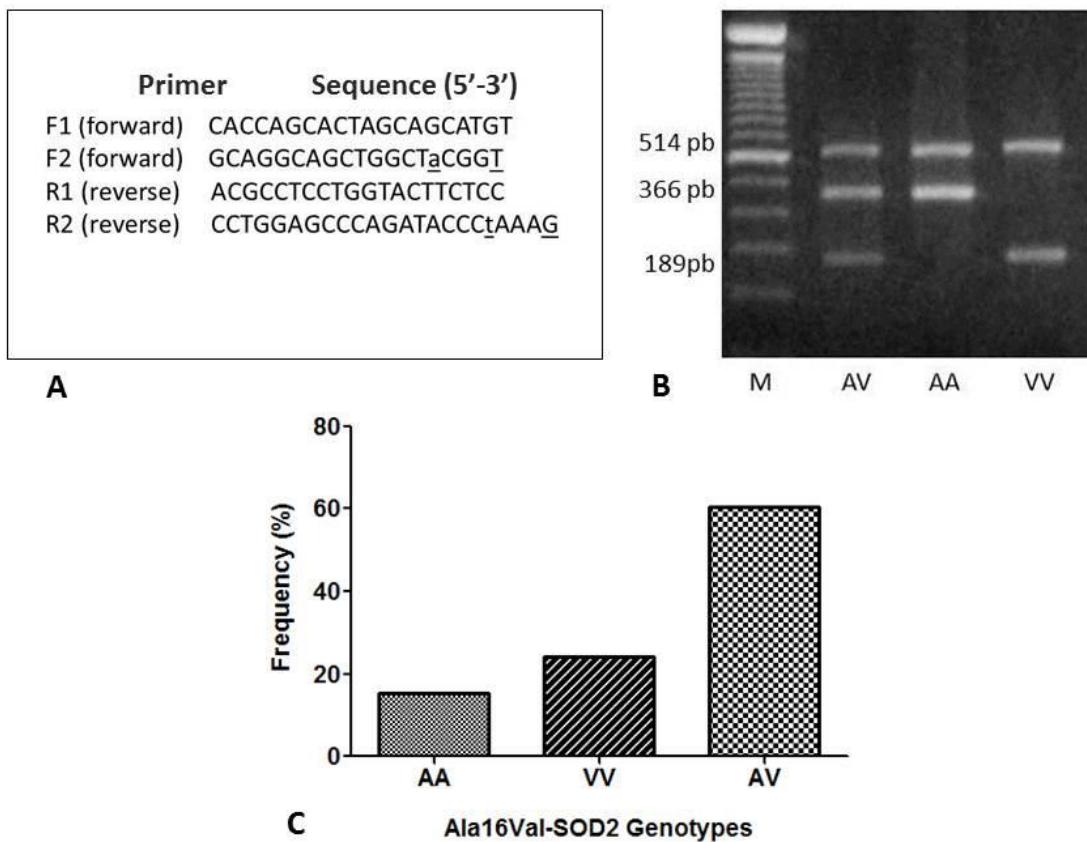


Figure 1 Ala16Val-SOD2 genotyping. (A) primers used to perform tetra-primer ARMS-PCR assay; (B) Gel electrophoresis showing different fragments used to identify the SOD2 genotypes; (C) Genotypic frequency distribution of AA, VV and AV genotypes in the 120 adult health samples subject that donate blood sample to perform the PBMCs *in vitro* assays.

PBMCs *in vitro* culture

From the subjects genotyped, a sub-group of 6-8 subjects per genotype with the Ala16Val-SOD2 genotype were invited to donate blood again in order to perform cell culture and

in vitro assays involving MTX exposure as previously described in Montano et al. (2012). The 20 mL blood samples were collected by venipuncture using heparinized vials and then transferred to tubes with Ficoll histopaque (1:1). The tubes were centrifuged for 30 minutes at 1450 rpm and PBMCs were positioned in the interphase. Further, PBMCs were centrifuged again (10 minutes at 2000 rpm) and transferred to culture medium containing 1 ml RPMI 1640 (GIBCO) with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin. Culture tubes for each subject were prepared at a final concentration of 1×10^6 cells/mL. The PBMC cultures were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24h before performing the experiments.

Viability and Cell proliferation assays

Based on previous reports that low dose MTX exerts anti-inflammatory and immunosuppressive effects that induce apoptosis and oxidative stress [3], we exposed PBMCs from carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes to different MTX concentrations (0.1-100 μM). The effect of genotype on cell viability was analyzed after 24 hours of exposure and the effect on cell proliferation was assessed after 72 hours of exposure. Cell viability after 24 h of MTX exposition and cell proliferation after 72 h of MTX exposition was analyzed by the MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) reduction assay as described by Mosmann [22]. Briefly, treated cells were incubated for 4 h with MTT reagent. After the formazan salt was dissolved, the absorbance was measured at 570 nm. The cells were photographed before the addition of DMSO in order to observe the formazan crystals. The MTT assay was performed using a 96-well plate in three independent replications. The Trypan blue dye exclusion assay was also performed to confirm the MTX effect on PBMCs viability [23]. The results were expressed as a percentage of the untreated control values.

2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) ROS production assay

The effect of 24 hours of MTX exposure on the oxidative metabolism of PBMCs from carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes was evaluated for different oxidant and antioxidant variables. The ROS level was determined using the non-fluorescent cell permeating compound 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. In this technique, the DCFDA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. After the designated treatment time, the cells were treated with DCFDA (10 µM) for 60 minutes at 37°C. In the assay, 1×10^5 cells from each sample were used to measured ROS levels [20]. The fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm, and the results were expressed as picomoles/mL of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) production from 2',7'-dichlorofluorescin in reaction with reactive oxygen molecules present in the samples.

Spectrophotometric assays

Oxidative stress indicators were measured in PBMCs samples. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured according to the modified method of Jentzsch et al. [24]. The carbonylation of serum proteins was determined by the Levine method with modifications [31]. Whole blood catalase activity was determined by the method of Aebi [25]by measuring the rate of decomposition of H₂O₂ at 240 nm. Whole blood superoxide dismutase activity was measured as described by McCord & Fridovich [26].The Glutathione peroxidase activity was measured as Glutathione Peroxidase as described by Flohe e Gunzler with modifications [27].

DNA comet genotoxicity assay

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [29] in accordance with the general guidelines for use of the comet assay []. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

Caspase and cytokine immunoassays

The analyses of caspases-8, -3, and -1 and cytokines IL-1, IL-6, TNF α , Ig γ , IL-10 were performed using the Quantikine Human Caspase Immunoassay to measure caspases in the cell culture supernatants, according to the manufacturer's instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed. The assay diluent RD1W was added (50 mL) to each well. Further, 100 mL of standard control for our sample was added per well, after which the well was covered with the adhesive strip and incubated for 1.5 hours at room temperature. Each well was aspirated and washed twice for a total of three washes. The antiserum of each molecule analyzed here was added to each well and covered with a new adhesive strip and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and the caspase-1 conjugate (100 mL) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated and 200 mL of substrate solution was added to each well and incubated for 20 min at room temperature. Finally, the 50 mL stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm.

mRNA expression analysis by quantitative QT-PCR assay

The expression levels of eight genes were measured by QT-PCR assay in PBMCs from carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes exposed to MTX: four genes belong to oxidative metabolism [superoxide dismutase genes (SOD1, SOD2), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX)]. The gene expression of some proteins involved in the apoptosis cascade, initiator caspase-8 (CASP 8) and effector caspase-3 (CASP 3) were also evaluated, as was the pro-apoptotic Bcl-2-associated X protein (BAX) gene, which has been shown to be involved in p53-mediated apoptosis.

Total RNA was isolated using TRIzol reagent. RNA yields were measured using a Nanodrop 2000 spectrophotometer. First strand cDNA was synthesized from total RNA (2 µg) using a First Strand cDNA Synthesis Kit and oligo dT primers. Q-PCR was performed in a 10 µl reaction that contained 0.5 µl of the cDNA and 1× KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) using the following PCR parameters: 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s followed by a melt curve of 65°C to 95°C in 0.5°C increments for 5 s. The expression level of beta-actin was used as an internal control. The relative expression was calculated using the comparative Ct and was expressed as the fold expression compared to the control. The specific primer pairs of antioxidant gene enzymes are presented used in this study were: SOD1 Forward GCACACTGGTGGTCATGAA and Reverse ACACCCACAAGCCAAACGACTT; SOD2 Forward- 5'GCCCTGGAACCTCACATCAA3' and Reverse- GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT; CAT = Forward- GATAGCCTT CGACCCAAGCA and Reverse- ATGGCGGTGAGTGTCAAGGAT; GPX = Forward- GGTTTTCATCTATGAGGGTGTTCC and Reverse- GCCTTGGT CTGGCAGAGACT; BAX = Forward- CCCTTTCTACTTGCCAGCAA and Reverse-

CCCGGAGGAAGTCCAATGT; Bcl-2 =Forward- GAGGATT GTGGCCTTCTTGAGT;
 Reverse- AGTCATCCACAGGGCGATGT; CASP3 = Forward-
 TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG and Reverse- TACCAGT GCGTATGGAGAAATGG;
 CASP 8= Forward- AGGAGCTGCTCTTCCGAATT and Reverse-
 CCCTGCCCTGGTGTCTGAAGT.

Statistical analysis

All analyses were carried out using the Graph Pad Prism 5 software, and the results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The comparison of all PBMC samples from different Ala16Val–SOD2 donors treated with and without MTX was performed using the two-way analysis of variance followed by a *post hoc* Tukey's test. All p values were two-tailed. The alpha value was set to < 0.05 to determine statistical relevance.

Results

The MTX exposure caused significant cytotoxicity from 1 μ M concentration in human PBMCs. However, this effect was significantly influenced by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism (Figure 2A). PBMCs from carriers with the V allele (VV and AV) exhibited decreased viability when exposed to MTX at 1, 10 and 100 μ M concentrations, whereas AA-PBMC viability was not affected by these treatments. These results were confirmed by trypan assay.

Based on these results, a second analysis was performed to evaluate the prolonged MTX effect at 10 and 100 μ M concentrations on PBMC proliferation. Again, the cell response was influenced by the Ala16Val-SOD2 polymorphism. As seen in Figure 2B, MTX did not influence the cell proliferation of PBMCs from A-carriers (AA and AV). The VV-PBMCs treated with

MTX showed significant decreases in proliferation rate when compared to the untreated control group. However, the influence on VV-cell proliferation was similar at the 10 and 100 μ M MTX concentrations.

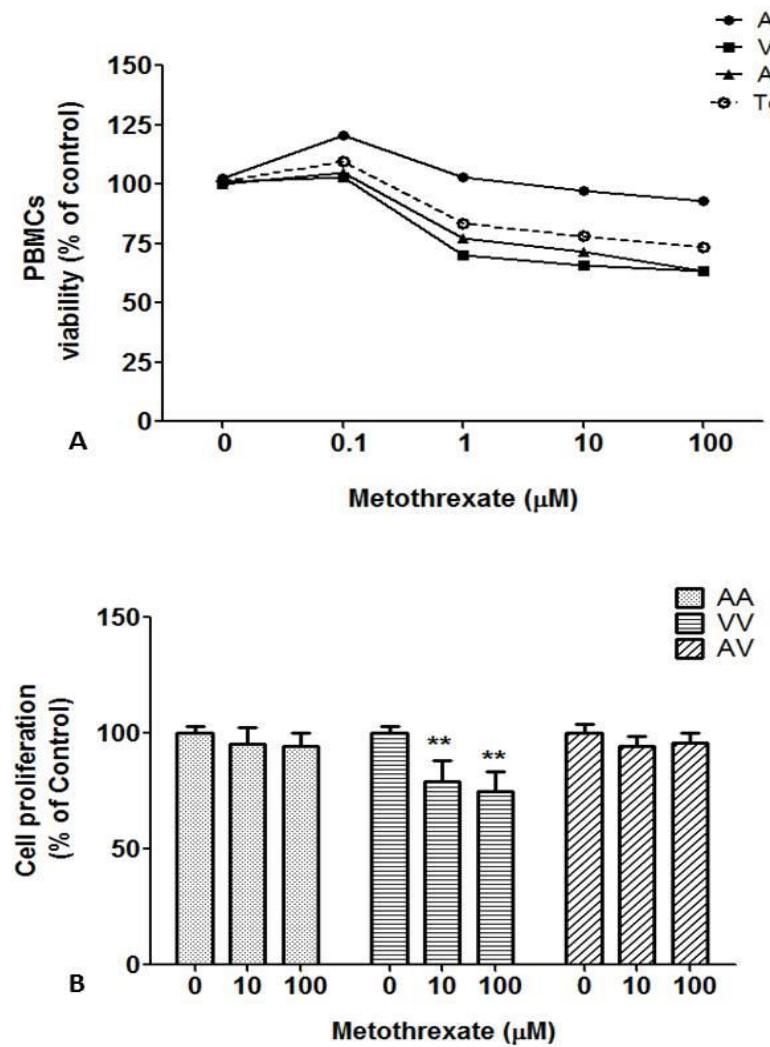


Figure 2 MTX effect on PBMCs carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes. (A) cell viability at different MTX concentrations evaluated after 24 h of MTX exposition; (B) cell proliferation at different MTX concentrations evaluated after 72 hours of MTX exposition. ** $p<0.01$ was determined by two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test. Viability and cell proliferation were evaluated by MTT assay.

The influence of MTX on PBMC oxidative metabolism after 24 hours of exposure was then analyzed, and the results are presented in Table 1. Lipoperoxidation as well as ROS levels increased significantly in PBMCs exposed to MTX independent of Ala16Val-SOD2 genotype. However, the effect on lipoperoxidation was not dependent on MTX concentration (10 and 100 μ M), whereas the increase in ROS levels only occurred at the higher MTX dose tested here (100 μ M). On the other hand, protein carbonylation was not affected in AA-PBMCs, whereas AV and VV PBMCs presented an increase in this oxidative parameter. However, the effect of MTX on protein carbonylation was dose-dependent only in VV-PBMCs.

The effects of MTX on antioxidant enzyme activity and gene expression were evaluated. However, considering the results obtained in the analysis of antioxidant activity, the effect on gene expression was evaluated only in cells exposed to 10 μ M MTX (Table 1, Figure 3). SOD1 was strongly affected by MTX exposure, resulting in decreased enzyme activity and gene expression independent of the Ala16Val-SOD2 genotype.

Table 1 Comparison of oxidative metabolism variables of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes exposed to Methotrexate

Variables	MTX (μ M)	Ala16Val-SOD2 Genotypes		
		AA Mean \pm sd	VV Mean \pm sd	AV Mean \pm sd
TBARS (mmol MDA/mg protein)	0	3.210 \pm 0.014 ^a	3.805 \pm 0.020 ^a	3.390 \pm 0.031 ^a
	10	5.165 \pm 0.274 ^b	5.307 \pm 0.08 ^b	6.290 \pm 0.215 ^b
	100	5.008 \pm 0.301 ^b	4.948 \pm 0.176 ^b	6.000 \pm 0.412 ^b
Protein carbonylation (mmol/mg protein)	0	0.226 \pm 0.023 ^a	0.201 \pm 0.023 ^a	0.195 \pm 0.024 ^a
	10	0.267 \pm 0.022 ^a	0.292 \pm 0.030 ^b	0.339 \pm 0.079 ^b
	100	0.213 \pm 0.015 ^a	0.329 \pm 0.035 ^c	0.306 \pm 0.04 ^b
ROS (DCF picomoles/mL)	0	3104 \pm 177 ^a	2680 \pm 199 ^a	2855 \pm 330 ^a
	10	3704 \pm 193 ^a	2829 \pm 132 ^a	2693 \pm 261 ^a
	100	5632 \pm 191 ^b	7311 \pm 269 ^b	4999 \pm 509 ^b
SOD1 (UMnOD/mg protein)	0	0.747 \pm 0.09 ^a	0.610 \pm 0.04 ^a	0.654 \pm 0.04 ^a
	10	0.507 \pm 0.05 ^b	0.423 \pm 0.05 ^b	0.456 \pm 0.06 ^b
	100	0.498 \pm 0.06 ^b	0.411 \pm 0.04 ^b	0.432 \pm 0.05 ^b
SOD2 (UMnOD/mg protein)	0	2.170 \pm 0.190 ^a	0.728 \pm 0.05 ^a	1.050 \pm 0.160 ^a
	10	1.577 \pm 0.125 ^b	0.756 \pm 0.05 ^a	0.870 \pm 0.270 ^a
	100	1.170 \pm 0.04 ^b	0.580 \pm 0.01 ^b	0.960 \pm 0.110 ^a
Catalase (K/mg protein)	0	0.050 \pm 0.004 ^a	0.043 \pm 0.008 ^a	0.033 \pm 0.008 ^a
	10	0.024 \pm 0.003 ^b	0.037 \pm 0.002 ^b	0.041 \pm 0.006 ^a
	100	0.027 \pm 0.003 ^b	0.041 \pm 0.018 ^a	0.039 \pm 0.004 ^a
GPX (U/mL)	0	4.01 \pm 0.82 ^a	11.04 \pm 2.02 ^a	11.75 \pm 3.04 ^a
	10	12.96 \pm 2.02 ^b	16.73 \pm 3.04 ^b	46.86 \pm 4.03 ^b
	100	20.53 \pm 3.50 ^c	22.23 \pm 3.06 ^c	36.39 \pm 3.02 ^c

MTX= methotrexate; sd= standard deviation; Different letters (a, b, c) indicate significant differences among each MTX treatment determined by analysis of variance followed by Tukey's post hoc test at p<0.05

In contrast, the SOD2 activity and the gene expression were influenced by the Ala16Val-SOD2 polymorphism. The AA-PBMCs exposed to MTX showed decreasing SOD2 activity.

However, SOD2 gene expression significantly was upregulated in the cells exposed to MTX. The VV-PMCs presented a decrease in SOD2 activity only when exposed to the higher MTX concentration (100 μ M). Unlike the AA-PBMCs, these cells presented SOD2 gene down regulation when compared to the control group. Despite the fact that AV-PBMCs also presented SOD2 gene down regulation, the SOD2 activity was maintained in cells treated with MTX.

Catalase activity decreased only in AA-PBMCs cells exposed to MTX. However, these cells did not demonstrate any effect on catalase gene expression. The PBMCs from carriers of the A allele (AA and AV) did not show a decrease in catalase levels, but the effect on catalase gene expression was evident. Whereas, VV-PBMCs exposed to MTX exhibited downregulated catalase gene expression, heterozygous cells demonstrated catalase upregulation.

After 24 hours of MTX exposure, PBMCs presented high levels of GPX enzyme when exposed to MTX drug, independent of genetic background. The GPX gene was strongly upregulated in cells treated with MTX when compared to untreated control cells.

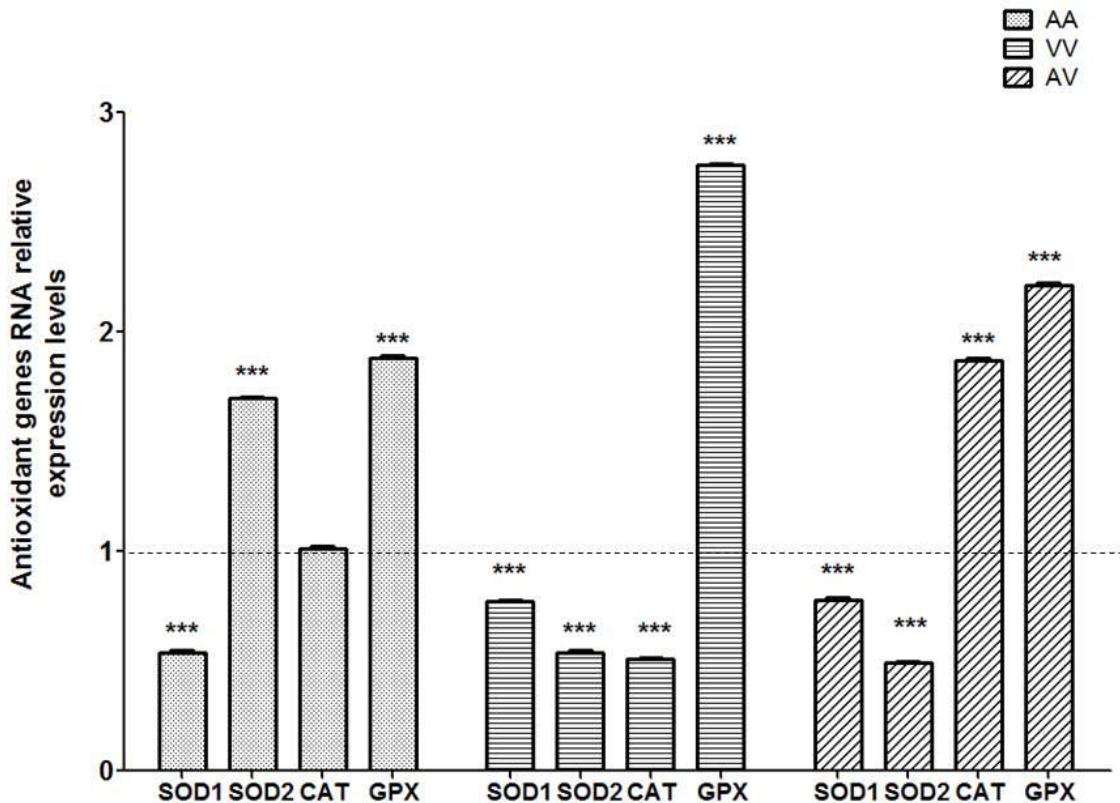


Figure 3 MTX (10 μ M) effect on antioxidant SOD1, SOD2,CAT and GPX genes expression. The dashed line on the value 1 indicate that each untreated control group of PBMCs carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes was used as reference to calculated the relative mRNA expression of the antioxidant enzymes. ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ were determined by two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test.

The potential genotoxic effect in survival cells exposed to MTX at 10 μ M concentration was evaluated. The results presented in Figure 4 show no statistically significant differences in terms of DNA damage in PBMCs obtained from carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes.

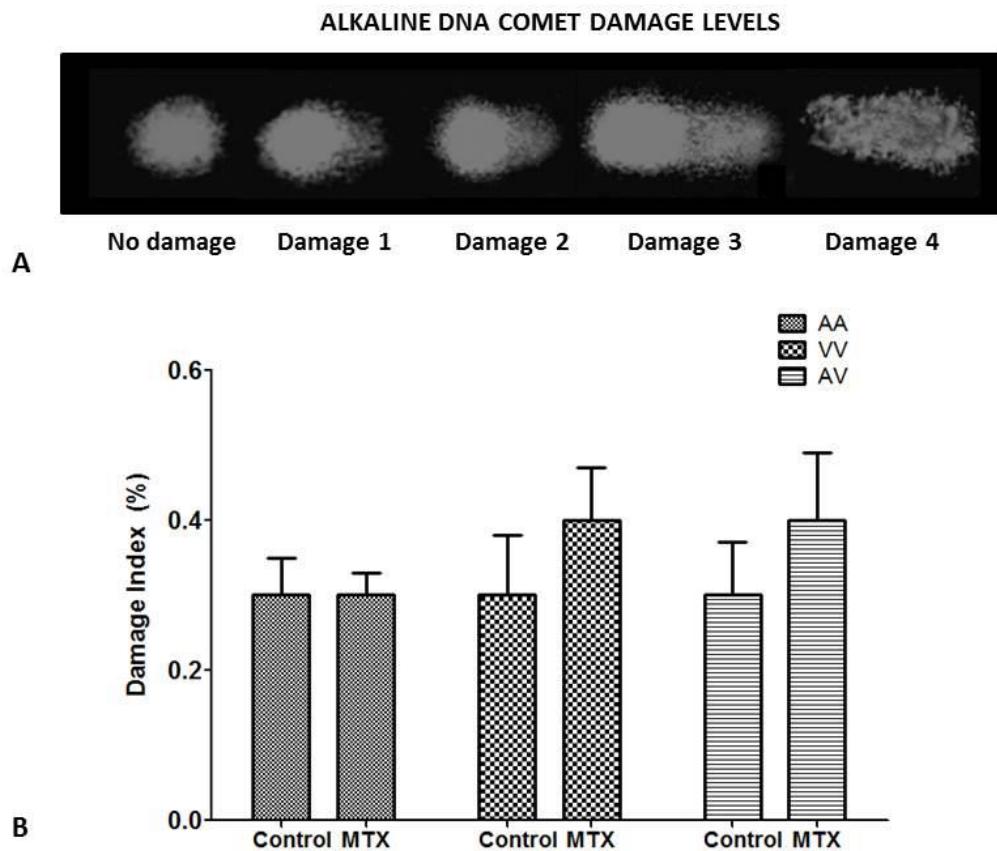


Figure 4: DNA damage to MTX exposition in PBMCs from subjects with different Ala16Val-SOD2 genotypes. (A) alkaline DNA comet assay showing nucleus without damage, and the nucleus with different damage levels; (B) Index damage of cells no-exposed and exposed to MTX 10 μ M. No significant differences were observed between treatments.

The cytokines involved in inflammatory response were also determined in PBMCs from carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes exposed to MTX. The results described in Table 2 show that 24 hours of 10 μ M MTX exposure significantly increase levels of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α and Ig γ) and significantly decrease IL-10, an anti-inflammatory cytokine. These results were similar in all PBMCs independent of Ala16Val-SOD2 genotype.

Table 2 Comparison of cytokines involved in immune response of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes exposed to Methotrexate

Variables	MTX (μ M)	Ala16Val-SOD2 Genotypes		
		AA	VV	AV
		Mean \pm sd	Mean \pm sd	Mean \pm sd
Interleukin 1 β (pg/mL)	0	46.3 \pm 5.9 ^a	51.7 \pm 2.0 ^a	44.6 \pm 3.7 ^a
	10	210.3 \pm 16.6 ^b	346.1 \pm 12.6 ^b	321.1 \pm 6.9 ^b
Interleukin 6 (pg/mL)	0	58.0 \pm 5.9 ^a	56.3 \pm 7.8 ^a	60.7 \pm 4.1 ^a
	10	251.9 \pm 43.1 ^b	472.8 \pm 108 ^b	433.3 \pm 8.6 ^b
TNF α (pg/mL)	0	86.0 \pm 4.3 ^a	86.3 \pm 7.6 ^a	88.6 \pm 2.14 ^a
	10	278.7 \pm 57.5 ^b	494.9 \pm 7 ^b	449.3 \pm 60.9 ^b
Ig γ (pg/mL)	0	103.2 \pm 9.4 ^a	100.7 \pm 7.6 ^a	108.6 \pm 6.8 ^a
	10	351.2 \pm 68.1 ^b	668.2 \pm 25.9 ^b	589.7 \pm 9.4 ^b
Interleukin 10 (pg/mL)	0	86.7 \pm 4.7 ^a	90 \pm 4.2 ^a	90.0 \pm 6.1 ^a
	10	68.3 \pm 16.3 ^b	54.6 \pm 9.6 ^b	46.9 \pm 2.4 ^b

MTX= methotrexate; sd= standard deviation; Different letters (a, b, c) indicate significant differences among each MTX treatment determined by analysis of variance followed by Tukey's post hoc test at p<0.05.

The effect of MTX on PBMC apoptosis was evaluated by determining caspase-3 and -8 gene (CASP) and protein levels. The results presented in Figure 5 show increased CASP-1, -3 and -8 levels in cells exposed to 10 µM MTX. This result was independent of the Ala16Val-SOD2 polymorphism. However, the gene expression analysis showed significant differences among PBMCs with different genotypes. VV-PBMCs exposed to MTX presented the down regulation of both CASP genes (-8 and -3) when compared to the control group. In contrast, casp-8 was upregulated in AA-PBMCs. The heterozygous genotype showed an intermediary pattern of casp gene expression, where casp-8 was downregulated similar to the VV genotype and casp-3 was upregulated similar to the AA genotype.

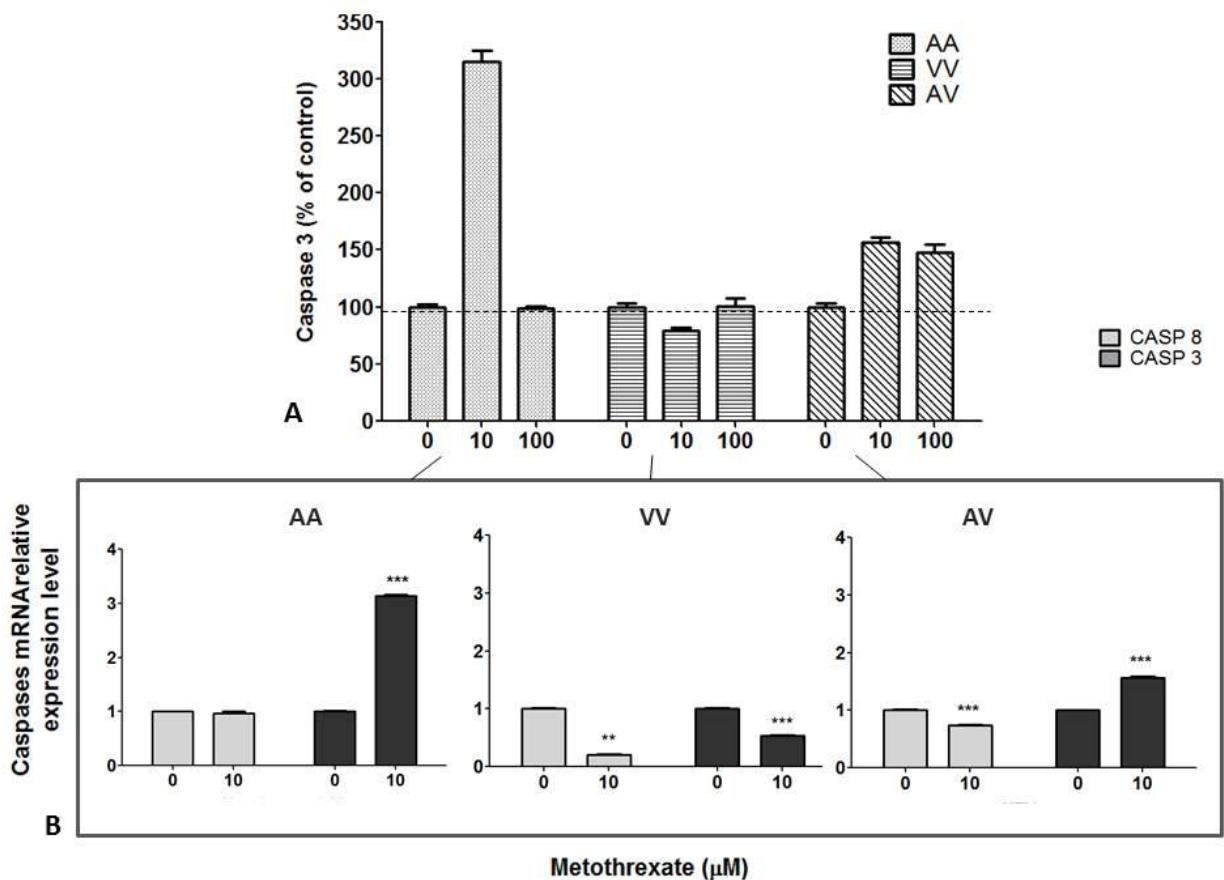


Figure 5 MTX (10 μ M) effect on (A) caspases 8 and 3 protein levels determined by immunoassay tests and (B) respective gene expression in PBMCs carriers different Ala16Val-SOD2 genotypes. The dashed line on the value 1 indicate that each untreated control group of PBMCs carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes was used as reference to calculated the relative mRNA expression of the antioxidant enzymes. ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ were determined by two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test.

The effect of MTX on BAX and Bcl-2 gene expression was also evaluated, and the results showed an imbalance between these genes that was influenced by the SOD2 genetic background (Figure 6). The BAX gene was down regulated only in AV-PBMCs, whereas the BAX gene was upregulated in homozygous genotypes. The Bcl-2 gene was strongly upregulated in AA and AV-PBMCs and slightly upregulated in VV-PBMCs. Considering that the BAX/Bcl-2 balance defines the proapoptotic and antiapoptotic cell state, we also calculated the BAX/Bcl-2 ratio. The

results showed an antiapoptotic ratio in AA and AV-PBMCs and a proapoptotic ratio in VV-PBMCs after 24 hours of 10 μ M MTX exposure.

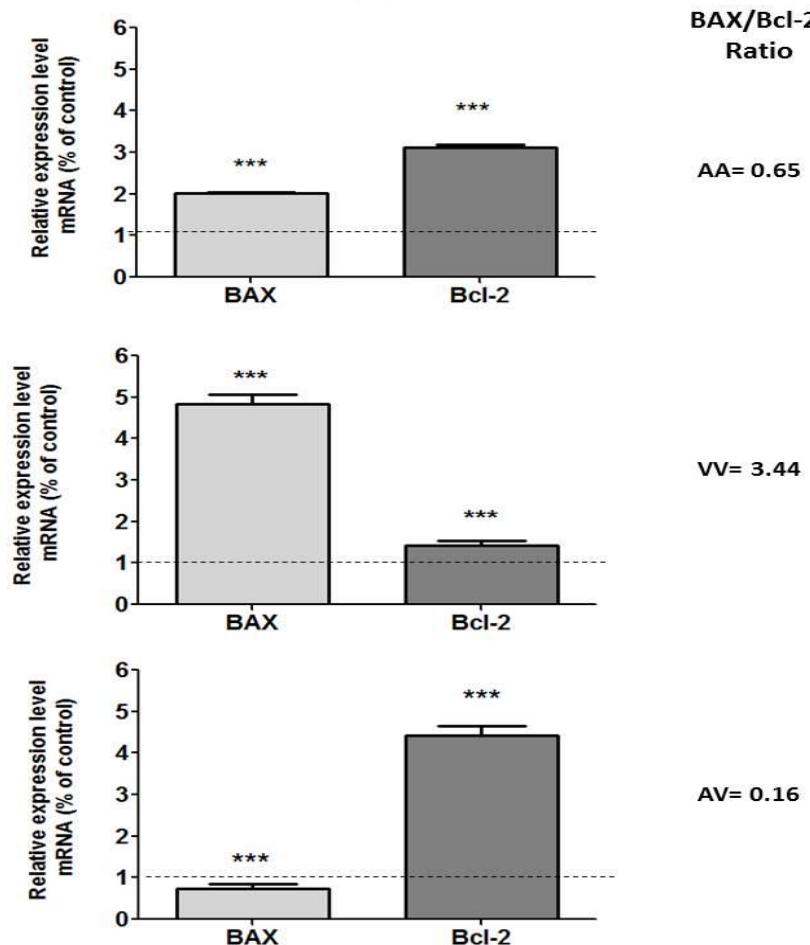


Figure 6 MTX (10 μ M) effect on BAX and Bcl-2 gene expression of PBMCs carriers different Ala16Val-SOD2 genotypes. The dashed line on the value 1 indicate that each untreated control group of PBMCs carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes was used as reference to calculate the relative mRNA expression of the antioxidant enzymes. ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ were determined by two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test. The ratio between expressions of BAX/Bcl-2 was also calculated. Values ≥ 1 indicate proapoptotic tendency and < indicate antiapoptotic tendency.

4. Discussion

The present study, confirmed that the cytotoxic effect of MTX, a commonly used anti-inflammatory, antiproliferative, and immunosuppressive drug, on human PBMCs involves an acute imbalance of cell oxidative and inflammatory metabolism and triggers apoptosis [14, 10, 11, 25]. However, our results showed that this effect was directly influenced by genetic background related to oxidative metabolism, specifically by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism.

The PBMCs obtained from healthy adult carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes showed a differential response to MTX in terms of cell viability and proliferation. Whereas AA showed some resistance to the immunosuppressive effect caused by MTX, presenting similar viability and cell proliferation levels than untreated cells, VV was more susceptible and presented reduced viability and cell proliferation. On the other hand, the heterozygous genotype (AV) showed an intermediary response to MTX exposure, observed as decreased cell viability as observed in VV-PBMCs and the maintenance of cell proliferation as observed in AA-PBMCs.

These results suggest that the SOD2 balance could play some pharmacogenetic or toxicogenetic role in the cellular MTX response. A robust number of studies have described that MTX at high concentrations causes oxidative stress in some types of cells. This observation was noted in the *in vitro* investigation performed by Chibbers et al. [30] which showed that MTX alone or in combination with Cu (II) was able to inhibit scavengers of ROS and exhibit pro-oxidant action. The oxidative imbalance in the Jurkat T lymphocytic line exposed *in vitro* to MTX was also described and related to apoptosis events [**Erro! Indicador não definido.**]. Another investigation showed that MTX-induced oxidative stress in liver mitochondria caused a significant increase in mitochondrial lipid peroxidation, protein carbonyl content, superoxide radical generation and also affected the mitochondrial thiol profile [31]. MTX concentrations \geq

10µM also cause reduced antioxidant enzyme levels including superoxide dismutase, catalase and glutathione levels.

In the present study, the effect of MTX on AA-PBMC viability and cell proliferation was less intense than that observed in V allele carriers, indicating that MTX toxicity could be influenced by oxidative metabolism involving SOD2 modulation. This suggestion was confirmed by the analysis of potential causal mechanisms associated with the differential MTX response of PBMC carriers with different Ala16Val-SOD2 genotypes. The results showed that some variables presented a similar response to MTX independent of genetic background, including the increase of lipoperoxidation, inflammatory cytokines and apoptotic CASPs (-8 and -3) and GPX activity and gene expression, and the decrease in SOD1 activity and gene expression and IL-10, an anti-inflammatory cytokine.

However, in contrast to that observed in cytokine modulation some oxidative and apoptotic markers were differentially modulated in the PBMCs from carriers with different Ala16Val-SOD2 genotypes.

Considering the oxidative metabolism, we observed that AA-PBMCs did not show an increase in protein carbonylation, as occurred in the VV and AV genotypes. These cells also showed a decrease in SOD2 activity although we also observed the up regulation of this gene and an important increase in GPX enzyme levels and gene expression. The AA cells treated with MTX showed an approximately four-fold increase in GPX enzyme levels when compared to the untreated control group. Despite the fact that the VV and AV cells also presented increased GPX activity when treated with MTX, this effect was not as intense. The AA-PBMCs exposed to MTX also presented a decrease in catalase activity despite the fact that the gene expression of this enzyme maintained levels similar to those observed in the control group.

The AA genotype has been associated with high efficiency to dismutate superoxide ions in hydrogen peroxide [18], and this property could be responsible for decreasing the oxidative stress caused by high levels of MTX and the subsequent decrease in apoptosis events observed in PBMCs from V allele carriers. In addition to the greater efficiency of AA-PBMCs in the dismutation of superoxide into hydrogen peroxide, these cells presented a significant increase in GPX levels when exposed to MTX, which probably offered some protection against toxic effects caused by hydrogen peroxide produced by superoxide dismutation.

The relevance of the AA genotype's efficiency in controlling superoxide anion and peroxide hydrogen levels in the cells exposed to MTX could have a consequence as a superior control mechanism for protein carbonylation production. Both superoxide and peroxide hydrogen are capable of altering proteins chemically, thereby influencing their function. The main protein modifications originating from such an increase in oxidative stress comprise direct oxidation, namely that of amino acids with a thiol group such as cysteine, oxidative glycation, and carbonylation. In this context, it is remarkable that oxidative protein carbonylation, apparently the most frequent type of protein modification in response to oxidative stress, is thought to be irreversible and destined only to induce protein degradation in a nonspecific manner [32].

Therefore, events that prevent the production of high levels of protein carbonylation, including SOD2 efficiency and increased GPX activity and gene expression observed in AA-PBMCs exposed to MTX could explain why this genotype has protective effects against apoptosis events caused by MTX exposure.

On the other hand, VV cells exposed to MTX presented higher lipoperoxidation, protein carbonylation and ROS levels than untreated cells (Table 1). These results indicated increase in H₂O₂ levels triggered by MTX. However, opposite effects on main enzymes that catalyze H₂O₂ were also observed, since VV cells exposed to MTX showed lower CAT activity and higher GPX

activity. These differences appear to be triggered by differential mRNA regulation of these enzymes (down regulation of CAT and upregulation of GPX genes). Considering the role of H₂O₂ in different signaling cellular cascades, this molecule is under sophisticated fine control of several antioxidant enzymatic molecules. However, despite CAT to be frequently used by cells to rapidly catalysis of H₂O₂ into less reactive gaseous oxygen and water molecules, the predominant scavengers of H₂O₂ in normal mammalian cells are likely other molecules as GPX and peroxiredoxins [33]. Our results suggest that in the presence of prooxidant molecules as MTX, the control of H₂O₂ production is directly influenced by efficiency of SOD2 enzyme. This suggestion can be partially corroborated by a previous study performed by Paludo et al (2012) suggested that Ala16Val-SOD2 polymorphism actively participates in the regulation of cellular redox environment involving H₂O₂ catalysis. However the nature of the differential regulation of enzymes involving in H₂O₂ catalysis need to be clarified from complementary studies using antagonist and agonist molecules of SOD2 enzyme.

The heterozygous genotype (AV) showed an intermediary response to MTX exposition when compared to homozygous genotypes (AA and VV) or, sometimes the response was similar to AA genotype or to VV genotype.

The lesser effect of MTX on AA-PBMCs can also be observed when the expression of BAX and Bcl-2 genes was analyzed. In many systems, members of the bcl-2 family modulate apoptosis, with the BAX/Bcl-2 ratio serving as a rheostat with which to determine the susceptibility to apoptosis. Bcl-2 protein is able to repress a number of apoptotic death programs. Therefore, Bcl-2 is specifically considered an important anti-apoptotic protein and is, therefore, classified as an oncogene. In contrast, overexpressed BAX accelerates apoptotic death [34]. In healthy cells, BAX protein is largely found in the cytosol. However, upon initiation of apoptotic signaling, Bax undergoes a conformational shift and becomes organelle membrane-associated, in

particular with the mitochondrial membrane. The main BAX effect involves the induction of opening of the mitochondrial voltage-dependent anion channel that results in the release of pro-apoptotic factors from the mitochondria, leading to the activation of CASPs [35].

The results showed differential Bax/Bcl-2 ratio gene expression in PBMCs from carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes exposed to MTX. Whereas the BAX/Bcl-2 ratio was below one in AA- and AV-PBMCs indicating a tendency to antiapoptotic events, VV-PBMCs showed a higher Bax/Bcl-2 ratio indicating the maintenance of cellular apoptosis. Therefore, these results confirmed the influence of Ala16Val-SOD2 on PBMC susceptibility to MTX exposure.

Another important result described here was the massive effect of MTX at the 10 µM concentration on human PBMC inflammatory cytokine levels. As previously mentioned, cells treated with MTX showed higher levels of IL-1 β , IL-6, TNF α and Ig γ . A reduction of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, was also observed in cells exposed to MTX. Some of the results on the MTX inflammatory effect of PBMCs exposed to high levels of this drug have been described in previous studies performed in experimental models. For example, nephrotoxicity in rats induced by high doses of MTX increase the TNF α cytokine levels [36]. Rats with hepatorenal oxidative injury induced by high doses of MTX also showed increasing TNF α and IL-1 β levels when compared to the untreated control group [37]. The number of studies analyzing the effect of MTX on IL-6 and Ig γ is much lower [22,38]. Therefore, to the best of our knowledge, the study of the concomitant effect of MTX on IL-1 β , CASP 1, IL-6, TNF α , Ig γ and IL-10 has not been previously published in the literature.

The clinical relevance of the data presented here could be related to the lower cytotoxic effect observed in AA-PBMCs exposed to MTX. This effect could be desirable in cancer patients undergoing chemotherapy using MTX. For example, neurocognitive sequelae associated with

oxidative stress have been described in pediatric lymphoblastic leukemia patients treated with MTX [38], as have hepatotoxic and nephrotoxic effects.

However, the immunosuppressive activities of MTX have been studied in the context of cell proliferation and recruitment, and an inverse effect of MTX at low concentrations on some inflammatory cytokines is well established. Low MTX doses are able to reduce some important cytokines as TNF α that are elevated in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis [39]. Taking into account the results described here and published in the literature, we can suggest that MTX presents an important dose-dependent modulation of immune cytokines in PBMCs. This effect does not seem to be directly influenced by oxidative metabolism involving SOD2 activity because the results found here were independent of the Ala16Val-SOD2 polymorphism.

In conclusion, despite the methodological limitations related to *in vitro* experimental studies including the limited number of subjects used to obtain PBMCs with different SOD2 genotypes, the results described here suggest that the differential modulation of the cell's superoxide-peroxide hydrogen balance is genetically determined by SOD2 gene variation, which could influence the MTX cytotoxic effect.

These results are in consonance with previous studies describing the toxicogenetic and pharmacogenetic effects of the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism on PBMCs exposed to xenobiotic molecules [19]. Another important effect observed in this study was the MTX effect on cytokines involved in the inflammatory response, but this result seems to not be influenced by SOD2 metabolism.

References

1. Mohammad A, Kilcoyne A, Bond U, Regan M, Phelan M (2008) Methotrexate information booklet study . *Clin Exp Rheumatol* 27: 649-650.
2. Khan ZA, Tripathi R, Mishra B (2012) Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects . *Expert Opin Drug Deliv* 9: 51-56.
3. Herman S, Zurgil N, Deutsch M (2005) Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflamm Res* 54:273-280.
4. Elango T, Dayalan H, Gnanaraj P, Malligarjunan H, Subramanian S (2013). Impact of methotrexate on oxidative stress and apoptosis markers in psoriatic patients (2013). *Clin Exp Med* [Epub ahead of print].
5. Kozub P, Simaljakova M (2011) Systemic therapy of psoriasis:methotrexate (2011). *Bratisl Lek Listy* 112:390-344.
6. Tobias H, Auerbach R (1973) Hepatotoxicity of long-term methotrexate therapy for psoriasis. *Arch Intern Med* 132:391-396.
7. Vardi N, Parlakpinar H, Ates B, Cetin A, Otlu A (2009) Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against_methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* 92: 2028-2033.
8. D'Andrea N, Triolo L, Margagnoni G, Aratari A, Sanguinetti CM (2010) Methotrexate-induced pneumonitis in Crohn's disease. Case report and review of the literature *Multidiscip Respir* 31:312-319.
9. Brock S, Jennings H R (2004) Fatal acute encephalomyelitis after a single dose of intrathecal h. *Pharmacoth* 24:673-676.
10. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK et al (2014) Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 385:215-23.
11. Malik F , Ranganathan P. (2013) Methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis: a status report. *Pharmacogen* 14:305-314.
12. Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. (2013) The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res* 47 :781-792.
13. Sutton A, Khouri H, Prip-Buus C, Cepanec C, Pessaire D, et al. (2003) The Ala16Val geneticdimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria . *Pharmacog* 13: 145-157.
14. Dos Santos Montagner GF, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP et al. (2010) Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol In Vitro* 24: 1410-1416.
15. Algarve TD, Barbisan F, Ribeiro EE, Duarte MM, Mânicica CMF et al. (2013) In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. *Genet Mol Res* 12: 5134-5144.

- 16.** Costa F, Dornelles E, Mânicá C MF, Algarve TD, Souza Filho OC, et al.(2012) Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod Biomed* 24:474-481.
- 17.** Montano MA, da Cruz IB, Duarte MM, Krewer C da C, da Rocha MI et al. (2012) Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytok* 60:30-33.
- 18.** Sakuma S1, Kato Y, Nishigaki F, Magari K et al (2001) Effects of FK506 and other immunosuppressive anti-rheumatic agents on T cell activation mediated IL-6 and IgM production in vitro. *Int Immunopharmacol* 1:749-57.
- 19.** Olsen NJ, Spurlock CF, Aune TM (2014) Methotrexate induces production of IL-1 and IL-6 in the monocytic cell line U937. *Arthritis Res Ther* 16:17-25.
- 20.** Thornberry N, Bull H, Calaycay J, Chapman K, Howard A, Kostura M, et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nat* 356: 768-774.
- 21.** Ruiz-Sanz JI, Aurrekoetxea I, Matorras R, Ruiz-Larrea MB (2011) Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 95:1601-1605.
- 22.** Mosmann, T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63.
- 23.** Burrow ME, Weldon CB, Tang Y, Navar GL et al (1998) Differences in susceptibility to tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Res* 58: 4940-4946.
- 24.** Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1983) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 20:251-256.
- 25.** Aebi H Catalase in vitro (1984) *Methods Enzymol* 105:121-126
- 26.** McCord JM, Fridovich I (1988) Superoxide dismutase: the first twenty years. *Free Radic Biol Med* 5:363-369.
- 27.** Flohé́ L, Gunzler WA (1984) Glutathione peroxidase and reductase in vitro. *Methods Enzymol* 105:114-121].
- 28.** Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Re* 175:184-191.
- 29.** Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B et al. (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay . International Comet Assay Workshop 4th. *Mutagenesis* 18:45-55.
- 30.** Chibber S, Hassan I, Farhan M, Naseem I (2011) In vitro pro-oxidant action of Methotrexate in presence of white light. *J Photochem Photobiol B* 104:387-393.
- 31.** Tabassum H, Parvez S, Pasha ST, Banerjee BD, Raisuddin S (2010) Protective effect of lipoic acid against methotrexate-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Food Chem Toxicol* 48:1973-1979.
- 32.** Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, et al. (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 10: 389–406.
- 33.** Nicholls P (2012) Classical catalase: ancient and modern. *Arch Biochem Biophys.* 525:95-101.

- 34.** Oltvai Z, Milliman C and Korsmeyer S J (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conversed homolog, Bax, that accelerates programmed cell death . Cell 74: 609-619.
- 35.** Weng C, Li Y, Xu D, Shi Y, Tang H (2005) Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. J. Biol. Chem 280: 10491–10500.
- 36.** Ibrahim MA, El-Sheikh AA, Khalaf HM, Abdelrahman AM (2014) Protective effect of peroxisome proliferator activator receptor (PPAR)- α and - γ ligands against methotrexate-induced nephrotoxicity. Immunopharmacol Immunotoxicol 36:130-137.
- 37.** Shandala T, Shen Ng Y, Hopwood B, Yip YC, Foster BK et al.(2012) The role of osteocyte apoptosis in cancer chemotherapy induced bone loss. J Cell Physiol 227: 2889-2897.
- 38.** Caron JE, Krull KR, Hockenberry M, Jain N, Kaemingk K, Moore IM (2009) Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia . Pediatr Blood Cancer 53: 551-556.
- 39.** Ma X, Xu S (2013) TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. Biomed Rep 1: 177-184.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo confirmou que o efeito citotóxico de MTX, um fármaco utilizado em neoplasias devido ao seu potencial antiproliferativo e em doenças auto-imunes devido sua ação imunossupressora. Estudos prévios demonstraram que em CMSP humanas, tal fármaco induz desequilíbrio oxidativo agudo, desencadeando apoptose (MUKHERJEE et al., 2013; ALI et al., 2014; MORSY et al., 2013). No entanto, nossos resultados mostraram que esse efeito foi diretamente influenciado pela herança genética relacionada com o metabolismo oxidativo, especificamente pelo polimorfismo Ala16Val do gene da SOD2. Assim, tais resultados sugerem um potencial efeito farmacogenético desse polimorfismo na resposta tóxica ao MTX.

Desse modo, a seguir serão discutidos alguns aspectos relevantes relacionados com os resultados aqui descritos.

As CMSP obtidas a partir de adultos saudáveis portadores de diferentes genótipos para o polimorfismo Ala16Val-SOD2 apresentaram uma resposta diferencial ao MTX em termos de viabilidade celular e proliferação. O genótipo AA demonstrou resistência aos efeitos do MTX, apresentando viabilidade e proliferação celular semelhantes aos níveis das células deste genótipo não tratadas com MTX. Já as CMSP-VV mostraram-se mais suscetíveis, apresentando redução significativa na viabilidade e proliferação celular. Por outro lado, o genótipo heterozigoto (AV) mostrou uma resposta intermediária à exposição ao MTX, apresentando diminuição da viabilidade celular semelhante às CMSP-VV e manutenção da proliferação celular como observado nas CMSP-AA.

Nessa perspectiva, será que a maior suscetibilidade do genótipo VV ao MTX também significaria uma melhor resposta terapêutica desse fármaco em pacientes com doenças auto-imunes? Essa é uma questão em aberto, já que investigações sugerem que o efeito antiinflamatório do MTX está relacionado com a indução da morte de células imunes. Por outro lado, portadores do genótipo VV também poderiam ser mais suscetíveis a desenvolver efeitos adversos associados a quimioterapias que usam níveis elevados do MTX. Estudos complementares que avaliem o impacto desse polimorfismo na resposta terapêutica de neoplasias e doenças autoimunes poderão esclarecer essa questão.

É bastante robusta a quantidade de estudos que têm descrito que o MTX em altas concentrações é capaz de induzir o estresse oxidativo em vários tipos celulares. Investigações como a de Chibber e colaboradores (2011), que expuseram *in vitro* linfócitos humanos ao MTX (50 µM) sozinho ou em combinação com Cu(II) (50 µM), demonstram que tanto o MTX individualmente como em combinação com Cu(II) foi capaz de causar estresse oxidativo em linfócitos, devido a capacidade de inibir as enzimas antioxidantes e outros sequestradores de EROS.

Herman e colaboradores (2005) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de investigar o grau de indução de apoptose por MTX em baixas doses (0,001, 0,01, 0,1, 1, e 10 uM) em células de linhagem linfocítica (Jurkat T, EL4T e Raji B) e de linhas celulares monocíticas (U937 e THP1). Para isso, analisaram se a geração de EROS poderia ser um possível mecanismo subjacente os eventos apoptóticos. Os resultados demonstraram que o MTX foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade e a proliferação celular em todas as linhagens. Concomitante a isso, houve elevação dos níveis de estresse oxidativo. Assim, os autores postularam que MTX pode induzir a apoptose por estresse oxidativo.

Outra investigação, com foco no metabolismo oxidativo, estudou se a toxicidade causada pelo MTX em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos poderia ser afetada pelo pré-tratamento desses animais com ácido lipoico. Nesse caso, o MTX causou um aumento significativo da peroxidação lipídica mitocondrial (LPO), dos níveis de carbonilação de proteínas e da produção de radicais superóxido, além de diminuir os níveis das enzimas antioxidantes SOD2 e GPX. O pré-tratamento dos ratos com ácido lipóico (35 mg/kg) foi capaz de afetar positivamente todos os parâmetros do estresse oxidativo avaliados.

Assim também, Mukherjee e colaboradores (2013) realizaram um estudo com camundongos albinos da raça swiss. Os animais receberam tratamento com MTX (20 mg/kg) durante 14 dias. O fígado desses animais foi analisado e os resultados demonstraram aumento da atividade das enzimas alanina transaminase, aspartato transaminase, desidrogenase láctica e fosfatase alcalina, além do aumento do estresse oxidativo evidenciado pelo aumento da geração de EROS e pelos níveis elevados de peroxidação lipídica. Houve ainda queda nos níveis das enzimas SOD, CAT e GPX, da heme oxigenase 1 hepática (HO-1) e da NAD(P)H Quinona oxidoredutase 1 (NQO-1). Dessa forma, o MTX foi capaz de aumentar a expressão de genes relacionados à apoptose, como o BAX e a caspase 3, além de regular negativamente proteínas

anti-apoptóticas, como a NF-κB-dependente de Bcl-2, sugerindo que o aumento do estresse oxidativo induzido pelo MTX está relacionado à ativação de rotas da apoptose.

No presente estudo, o efeito do MTX em CMSP-AA, quando analisados os parâmetros relacionados à viabilidade e proliferação celular, foi menos intenso do que o observado em CMSP portadoras do alelo V, indicando que a toxicidade de MTX pode ser influenciada por um metabolismo oxidativo que envolve a modulação da SOD2. Essa hipótese foi confirmada pela análise de potenciais mecanismos causais associados à resposta diferencial de CMSP portadoras de diferentes genótipos Ala16Val-SOD2 ao MTX.

Os resultados demonstraram que algumas variáveis apresentaram resposta semelhante ao MTX independente de genótipo, incluindo o aumento da lipoperoxidação, dos níveis das citocinas inflamatórias, das caspases 3 e 8 (diretamente relacionadas a apoptose), da atividade e expressão gênica da GPX, da diminuição na expressão gênica e atividade da SOD1 e da citocina antiinflamatória IL-10.

No entanto, outros marcadores do metabolismo oxidativo-inflamatório, bem como da rota apoptótica, foram diferencialmente modulados nas CMSP com diferentes genótipos Ala16Val-SOD2. Considerando o metabolismo oxidativo, observou-se que nas CMSP-AA não houve aumento nos níveis de carbonilação de proteínas, diferentemente do que ocorreu nas CMSP-VV e AV. As CMSP-AA também mostraram uma diminuição na expressão do gene da SOD2, porém quando analisada a atividade da SOD2, esta diminuiu em todos os genótipos.

As células AA tratadas com MTX apresentaram aumento de cerca de quatro vezes nos níveis da enzima GPX quando comparado com o grupo controle sem tratamento. Apesar do fato de as células VV e AV também apresentarem aumento de atividade GPX quando tratados com MTX, esse efeito não foi tão intenso.

Quanto a atividade da CAT, as CMSP-AA expostas ao MTX apresentaram diminuição. Entretanto, quanto a expressão do gene da enzima CAT, os níveis mantiveram-se semelhantes aos observados no grupo controle.

Além disso, o genótipo AA tem sido associado a alta eficácia em dismutar o íon O_2^- em H_2O_2 (MONTAGNER et al., 2010). Essa propriedade pode ser responsável por diminuir o estresse oxidativo causado pelos altos níveis de MTX e consequente redução nos eventos de apoptose observada em CMSP portadoras do alelo A.

Além da maior eficiência das CMSP-AA na dismutação do O_2^- em H_2O_2 , tais células apresentaram um aumento significativo nos níveis de GPX quando expostas ao MTX, o que provavelmente ofereceu alguma proteção contra os efeitos tóxicos causados pelos altos níveis de H_2O_2 .

A maior eficiência na dismutação do O_2^- em H_2O_2 , encontrada no genótipo AA, poderia ter como consequência um maior controle no mecanismo de produção de proteínas carboniladas. Tanto o O_2^- quanto o H_2O_2 são capazes de alterar quimicamente as proteínas, influenciando assim sua função. As principais modificações proteicas provenientes do aumento do estresse oxidativo são a oxidação direta, a de aminoácidos com um grupo tiol (como a cisteína), a glicação oxidativa e a carbonilação. Nesse contexto, é notável que a carbonilação de proteínas, aparentemente o tipo mais frequente de modificação proteica, ocorra em decorrência do estresse oxidativo. (DALLE-DONNE et al., 2006).

Portanto, os eventos que impedem a produção de níveis elevados de proteínas carboniladas, incluindo a eficiência da SOD2 e o aumento da atividade da enzima e expressão do gene da GPX, observado em CMSP-AA expostas ao MTX, poderiam explicar porque esse genótipo tem efeito protetor contra eventos de apoptose causados pela exposição ao MTX.

O menor efeito do MTX em CMSP-AA também pode ser observado na análise da expressão dos genes BAX e Bcl-2. Em muitos sistemas, a apoptose é controlada pela presença e regulação de proteínas de membrana mitocondrial da família da Bcl-2, tais como a Bax e a Bcl-2. A Bax é um gene que promove a morte celular, enquanto a Bcl-2 promove a proteção. A proteína Bcl-2, sintetizada a partir do gene Bcl-2 é capaz de reprimir uma série de rotas que levam a apoptose e, por isso, é considerado uma importante proteína antiapoptótica, sendo consequentemente classificada como um oncogene. Em contraste, a superexpressão da Bax acelera os processos de apoptose (OLTVAI et al., 1993). Em células saudáveis, a proteína Bax é largamente encontrada no citosol e quando a sinalização pró-apoptose é ativada, a Bax é translocada para a membrana mitocondrial externa. Na membrana, sofre alterações conformacionais que elevam a permeabilidade do poro mitocondrial, levando a liberação de moléculas pró-apoptóticas, tais como citocromo C, AIF e Smac/DIABLO (“second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI”) (FAN et al., 2005). Proteínas antiapoptóticas como o Bcl-2 podem se ligar seletivamente à conformação ativa de Bax e prevenir sua inserção na membrana mitocondrial externa, mantendo a

permeabilidade normal do poro e, prevenindo assim, a liberação dos fatores pró-apoptóticos (ANTONSSON e MARTINU, 2000). Dessa forma, a razão BAX/Bcl2 pode servir como referência para se determinar a suscetibilidade à apoptose.

Os resultados mostram uma expressão diferenciada na relação BAX/Bcl-2 em CMSP portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 expostas ao MTX. Enquanto a relação BAX/Blc2 estava abaixo de 1 em CMSP portadoras do alelo A (AA/AV), indicando assim tendência a eventos antiapoptóticos, as CMSP-VV apresentaram aumento na relação BAX/Bcl-2, indicando ativação de rotas de apoptose celular. Portanto, nossos resultados confirmam a influência do Ala16Val-SOD2 na suscetibilidade de CMSP expostas ao MTX.

Outro resultado importante aqui descrito foi o efeito maciço do MTX em CMSP na concentração de 10 µM, que resultou no aumento dos níveis das citocinas inflamatórias humanas. As células tratadas com MTX apresentaram maiores níveis de IL-1 β , caspase 1, IL-6, TNF α e Ig γ , com uma redução da IL-10, que uma citocina antiinflamatória.

Alguns dos resultados sobre o efeito inflamatório do MTX em CMSP expostas a altos níveis dessa droga têm sido descritos em estudos anteriores realizados em modelos experimentais. Por exemplo, a nefrotoxicidade induzida por doses elevadas de MTX em ratos foi capaz de aumentar os níveis da citocina TNF α (IBRAHIM et al., 2014). Ratos com lesão oxidativa hepatorrenal induzida por doses elevadas de MTX apresentaram aumento nos níveis de TNF α e de IL-1 β quando comparados com o grupo controle não tratado (SHANDALA ET AL., 2012).

Estudos que relacionam o efeito do MTX em relação a IL-6 e Ig γ são bastante restritos. Um dos poucos estudos que cita a influência do MTX na modulação da IL-6 foi realizado por Olsen e colaboradores (2014), no qual células da linhagem U937 (monócitos) foram tratadas nas concentrações de 0,01-0,1 e 1µM por 24 e 72 horas, sendo que o MTX foi capaz de induzir aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 e TNF α , independente de concentração e/ou tempo de exposição.

Estudos *in vitro* sobre o efeito do MTX em relação aos níveis de caspase 1 e IL-10 parecem ainda não terem sido publicados na literatura.

A relevância clínica dos dados aqui apresentados pode estar relacionada ao efeito citotóxico mais baixo observado em CMSP-AA saudáveis expostas ao MTX. Assim, pacientes portadores do genótipo AA em tratamento quimioterápico deveriam, aparentemente, receber uma

dose mais elevada de MTX do que aqueles portadores do genótipo VV, pois estes tem uma resposta citotóxica muito mais acentuada que aqueles. Pacientes portadores do genótipo VV poderiam apresentar efeitos adversos mais graves que os demais pacientes e decorrência da maior suscetibilidade a citotoxicidade apresentada por esse genótipo (CELIK et al., 2013; MORSY et al., 2013; ALI et al., 2014).

Portanto, considerando os resultados aqui descritos e publicados na literatura, pode-se sugerido que o MTX apresenta uma importante modulação dependente da dose na resposta imune de citocinas em CMSPs. Esse efeito não parece ser diretamente influenciado pela metabolismo oxidativo envolvendo a atividade da SOD2, porque os resultados aqui encontrados foram independentes do polimorfismo Ala16Val-SOD2.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, apesar das limitações metodológicas relacionadas aos estudos experimentais *in vitro*, incluindo o número limitado de indivíduos utilizadas para se obter as CMSP de diferentes genótipos Ala16Val-SOD2, os resultados aqui descritos sugerem que a modulação diferencial dos níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio são geneticamente determinadas pela variação do gene SOD2, o que poderia influenciar na resposta citotóxica ao MTX.

Esses resultados estão em consonância com estudos anteriores que descrevem os efeitos toxicogenéticos e farmacogenéticos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 em CMSP expostas a moléculas xenobióticas (COSTA et al, 2012; ALGARVE et al., 2013).

Outro efeito importante observado nesse estudo foi o efeito do MTX em citocinas envolvidas na resposta inflamatória. Entretanto, esse resultado não parece ser influenciado pelo metabolismo da SOD2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Cat in vitro. **Methods Enzymology.** v.125, p.121-126, 1984.
- ALGARVE, T.D. et al. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. **Genetics Molecular Research.** v.12, p. 5134-5144, 2013.
- ALI, N et al. Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis . **Molecular and Cellular Biochemistry.** v.385, p.215-223, 2014.
- AYROMLOU, H. et al. Oxidative effect of methotrexate administration in spinal cord of rabbits. **Journal of Pakistan Medical Association.** v.61, n.11, p.1096-1099, 2011.
- BAG, A.; BAG, N. Target Sequence Polymorphism of Human Manganese Superoxide Dismutase Gene and Its Association with Cancer Risk: A Review. **Cancer Epidemiology Biomarkers, Prevention.** v.17, p.3298, 2008 .
- BARRY, H.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Bristish Journal of Pharmacology.** v.142, p.231-255, 2004.
- BARZILAI A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA repair.** v.3, p.1109-1115, 2004.
- BERKUN, Y. et al., Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. **Annals of the Rheumatic diseases.** v.63, p.1227-1231, 2004.
- BICA,C.G. et al. MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. **Pathology Oncology Research.** v.15, p.19-24, 2009.
- BICA, C.G. et al. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics.** v.196, p.153-158, 2010.
- BORCHERS, A.T. et al.The use of methotrexate in rheumatoid arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism.**v.34,p.465-483,2004.
- BUCCHERI, V.; LORENZI, T.F. Atlas de hematologia: Clínica hematológica ilustrada. Guanabara Koogan, v.1, p. 351-398, 2006.

- BYDLOWSKI, S. P.; MAGNANELLI, A. C.; CHAMONE, D. de A. F. Hiper-homocisteinemia e doenças vaso-oclusivas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** v.71, p. 69-76, 1998.
- CARON, J.E. et al. Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood Cancer.** 2009.
- CATALGOL, B. K.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicology in Vitro.** v.21, p.1538-1544, 2007.
- CELIK, F. et al. Neuroprotective effects of carvacrol and pomegranate against methotrexate-induced toxicity in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences.** v.17, p.2988-2893, 2013.
- CHIBBER, S. et al. In vitro pro-oxidant action of Methotrexate in presence of white light. **Journal of Photochemistry and Photobiology.** v. 104 , p. 387–393, 2011.
- COSTA, F. et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reproductive BioMedicine Online.** v.24, p.1-8, 2012.
- COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine.** v.22, p.217-246, 2001.
- COUTO, A.C. et al. Tendência de mortalidade por leucemia infantil num período de 25 anos. **Jornal Pediátrico Rio de Janeiro.** v.86, n.5, p. 405-410, 2010.
- CRONSTEIN BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. **Pharmacology.** v.57, p.163-172, 2005.
- DALLE-DONNE, I. et al. (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.** v.10, p. 389–406, 2006.
- DAVE, S. et al. Inhibition of Adipogenesis and Induction of Apoptosis and Lipolysis by Stem Bromelain in 3T3-L1 Adipocytes. **Plos One.** v. 7, p. 1-12, 2012.
- DE EUSEBIO E, ARMARIO-HITA JC, DE MIQUEL VA. Treatment of Psoriasis: Focus on Clinic-based Management with Infliximab. **American Journal Clinical Dermatology.** v. 15, p. 5-16, 2014.
- DESALERMOS, A. P.; FRANK, S.; FARAYE, F. A. Recurrent Bell's Palsy in a Patient With Crohn's Disease on Methotrexate. **Journal of Clinical Gastroenterology.** 2014

DUARTE, M.M. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical Biochemistry**. v.43, p.1118-1123, 2010.

ESPOSITI, M.D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**.v.26,p.335-340,2002.

FEAGAN, B. G. et al. A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North AmericanCrohn's Study Group Investigators. **The New England Journal of Medicine**. v.342, p. 1627-1632, 2000.

FILLEY, C.M.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K. Toxic encephalopathy. **The New England Journal of Medicine**. v.345, p.425-32, 2001.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and their related matters. **Journal Biology Chemical**. v.272, p. 18515-18517, 1997.

FRONZA, A. B. et al. Association between auditory pathway efferent functions and genotoxicity in young adults. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. v. 77, p. 107-114, 2011.

FUKAI, T. et al. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**. v. 55, p. 239– 249, 2002.

GURNEY, J.G.; ANDRINE, R.; SWENSEN, M. B. Incidence of cancer in children in the United States. Sex- race , and 1-year age-specific rates by histologic type. **Cancer**. v. 75, n. 8 p. 2186-2195, 1995.

HÁ, T. T. N. et al. Elevated Levels of Cell-free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **Plos One**. v. 6, p. 1-7, 2011.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions** .v. 35,p.1147-1150, 2007.

HERMAN, S.; ZURGIL, N.; DEUTSCH, M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. **Inflammation Research**.v. 54, p.273-280, 2005.

HOWARD, A.N. et al. ABT-737, a BH3 mimetic, induces glutathione depletion and oxidative stress. **Chemotherapy and Pharmacology**. v.65, p.41-54, 2009.

IBRAHIM. M,A.et al.Protective effect of peroxisome proliferator activator receptor (PPAR)- α and - γ ligands against methotrexate-induced nephrotoxicity. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**.v.36, p.130-13, 2014.

IYER, L.; RATAIN, M.J. Pharmacogenetics and cancer chemotherapy. **European Journal Cancer**. v.34, p.1493-1499, 1998

JAHOVIC, N. et al. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. **Journal of Pineal Research.** v.34, p. 282-287, 2003.

JAKUBOVIC, B. et al. Methotrexate induced pulmonary toxicity. **Respiratory Journal.** v.20, p.153-155, 2013.

JENEY, V.; ITOH, S.; WENDT, M. et al. Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. **Circulation Research.** v. 96, n. 7, p. 723–729, 2005.

KAGER L. Genomic strategies to improve outcome and individualize therapy in cancer: the paradigm of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of the Balkan Union of Oncology.** v, 14, p.181-186, 2009.

KALANTZIS, A. et al. Oral effects of low-dose methotrexate treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology.** v.100, p.52-62, 2005.

KASTELER JS, CALLEN JP. Low-dose methotrexate administered weekly is an effective corticosteroid-sparing agent for the treatment of the cutaneous manifestations of dermatomyositis. **Journal Americam Academy Dermatology.** v. 36, p. 67-71, 1997.

KHALADE, A. et al. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Environmental Health,** v.28, p.9-31, 2010.

KEBRIAEI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R.A. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and classification. **Best Practice & Research Clinical Haematology.** v. 15, n. 4, p. 597-521, 2003.

KENNETH KAUSHANSKY, M.D. (edit.) **50 years Americam Society of the Hematology.** 2008

KRAUSE, D. et al. The positive influence of methotrexate on the mortality of patients with rheumatoid arthritis is partly independent of its effect on disease activity: results of a re-evaluation 18 years after baseline. **Clinical Experimental Rheumatology.** 2014.

KUMAGAI, K. et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. **International Journal Molecular Medicine.** v.11, p. 593-600, 2003.

LAHARIE, D. et al. The liver and methotrexate. **Gastroentérologie Clinique et Biologique,** v. 32, p. 134-142, 2008.

LEE, S. E.; JU, E. M.; KIM, J. H. Antioxidant activity of extracts from Euryale ferox seed. **Experimental and Molecular Medicine.** v. 34, p. 100-106, 2002.

LIMA, A. F. **Farmacogenética da AR.** 2012 Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina)-Universidade do Porto,Porto, 2012.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinical Chimical Acta.** v. 380, p.50-58, 2007.

MARQUES, S. A. MTX na psoríase: Consenso Brasileiro de Psoríase. Sociedade Brasileira de Dermatologia: Botucatu, SP. 2009. Disponível em: <<http://www3.sbd.org.br/Img/PagDefault/flash/Arquivos%5CPdfs%5CCapitulo8.pdf>> Acesso em: 01/07/2013.

MENEGAUX, F et al. Maternal alcohol and coffee drinking, parental smoking and childhood leukemia: a French population-based case-control study. **Pediatric and Perinatal Epidemiology.** v. 21, p.293–299, 2007.

MENEGAUX, F. et al. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukemia. **Occupational and Environmental Medicine.** v.63, p.131-134, 2006.

MILNE, E, et al. Maternal consumption of coffee and tea during pregnancy and risk of childhood ALL: results from an Australian case-control study. **Cancer Cause Control.**v.22, p.207–218, 2011.

MORSY, M.A. et al. Curcumin ameliorates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. **Advances in Pharmacological Sciences.** p.01-07, 2013.

MORABITO, F. et al. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. **Mediators Inflammatory.** v.13, p. 381-383, 2004.

MONTAGNER, G.F.F.S. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different Manganese Superoxide Dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in vitro.** v. 5, p. 1410-1416, 2010.

MONTANO, M.A.E et al. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine.**v.9, p. 12, 2012.

MUKHERJEE. S. et al. Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF-κB pathways. **Journal Nutrition Biochemical.** v. 24, p.2040-2050, 2013.

MONTIEL, I.J.A. et al. SOD2 gene Val16Ala polymorphism is associated with macroalbuminuria in Mexican Type 2 Diabetes patients: a comparative study and meta-analysis. **BMC Medical Genetics.** v.14, p.110, 2013.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A. Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry.** v. 49, p. 1183-1186, 2001.

NEVES, C.; JORGE R.; BARCELOS A. A Teia de Toxicidade do MTX. **Acta Reumatology Portugal.** v. 34, p. 11-34, 2009.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry.** v.42, 2001;

OLIVEIRA, C. C. DE. **Avaliação da ação do MTX sobre as alterações inflamatórias associadas à obesidade.** 2010. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde-Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2010.

OLTVAI, Z.; MILLIMAN, C.; KORSMEYER, S. J.; Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conversed homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell.** v.74, p.609-619, 1993.

PHILLIPS, D.C. ; WOOLLARD, K.J.; GRIFFITHS, H.R. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. **British Journal Pharmacology.** v. 138, p: 501-511, 2003.

PROTAS, P.T. et al. Cerebrospinal fluid oxidative stress during chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia in children. **Journal of Pediatric of Hematology/Oncology.** v.27, n.4, p.306-313, 2010.

PUI, C. H.;EVANS,W.E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine.** v.354, p.166-178, 2006.

RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in Biochemical Sciences.** v.25, p.502-508, 2000.

RANGANATHAN, P. An update on methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. **Pharmacogenomics.** v.9, p.439-451, 2008.

RANGANATHAN, P.; MCLEOD, H.L. Methotrexate Pharmacogenetics The First Step Toward Individualized Therapy in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism.** v.54, p. 1366-1377, 2006.

RAU, R. ; HERBORN, G. Benefit and risk of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis. **Clinical Experimental Rheumatology.** v. 22, p. 83-94, 2004.

REGO-PÉREZ, I. ; FERNÁNDEZ-MORENO, M.; BLANCO.F.J. Gene Polymorphisms and Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis. **Current Genomics.** v.9, p.381-393, 2008.

REIS, R.S.; SANTOS, M.O.; THULER, L.C.S. Incidência de tumores pediátricos no Brasil. **Revista Brasileira do Cancer.** v. 53, p. 5-15, 2007.

- RIBEIRO, K.B.; LOPES, L.F.; CAMARGO, B. Trends in childhood leukemia mortality in Brazil and correlation with social inequalities. **American Cancer Society**. v.110, n.8, p.1823-1831, 2007.
- RUBNITZ, J.E. et al. Transient encephalopathy following high-dose methotrexate treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**. v. 12, p.1176-1181, 1998.
- SALGADO, J. et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes predict response and toxicity to capecitabine-raltitrexed in colorectal cancer. **Oncology Reports**. v.17, p.325-328, 2007.
- SHANDALA T. et al. The role of osteocyte apoptosis in cancer chemotherapy induced bone loss. **Journal of Cellular Physiology**. v.227, p.2889-2897, 2012.
- SHUPER, A. et al. Methotrexate treatment protocols and the central nervous system: significant cure with significant neurotoxicity. **Journal of Child Neurology**. v.15, p.573-580, 2000.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184-191, 1988.
- SINHA, K. et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives Toxicology**, v. 87, p.1157-1180, 2013.
- SPRINGER, J. et al. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): impact of maintenance therapy duration. **Medicine**. v. 93, p; 82-90, 2014.
- STENZEL, S.L. et al. Oxidative stress and neurobehavioral problems in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients undergoing chemotherapy. **Journal Pediatric Hematology Oncology**. v.32, p.113-118, 2010.
- STURTZ, L.A. et al. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. **Journal of Biological Chemistry**. v.41, 2001.
- TAUFER, M. et al. ‘Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process?’ **Journal Gerontology Biological Science Medical** .v.60, p.432-438, 2005.
- TIAN, C et al. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a metaanalysis. **Diabetologia**. v.54, p.803-811, 2011.
- TIAN, H.; CRONSTEIN, B.N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**.v.3, p.168–173, 2007.

- UNFER, T.C. et al. Non-genomic, direct modulatory effect of 17 β -estradiol, progesterone and their synthetic derivatives on the activity of human erythrocyte CuZn superoxide dismutase. **Free Radical Research.** v.47, n.3, p. 219–232, 2013.
- URAZ, S.; TAHAN, V.; AYGUN, C. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. **Digestive Diseases and Sciences.** v.53, p. 1071-1077, 2008.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions.** v.160, p.1-40, 2006.
- VASCONCELOS, S.M. L. et al. EROs e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova.** v. 30, p.1323-1338, 2007.
- VEZMAR, S. et al. Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. **Cancer Chemotherapy.** v.49, p. 92-104, 2003.
- VEZMAR, S. et al. Methotrexate-Associated Alterations of the Folate and Methyl-Transfer Pathway in the CSF of ALL Patients With and Without Symptoms of Neurotoxicity. **Pediatric Blood Cancer.** v. 59, p.26–32, 2009.
- WRIGHT, JANE C. et al. An evaluation of folic acid antagonists in adults with neoplastic diseases. A study of 93 patients with incurable neoplasms. **Journal of the National Medical Association.** v.43, p.211–240, 1951
- WU, Z. Development of methotrexate proline prodrug to overcome resistance by MDA-MB-231 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v.20, n.17, p.5108-5112, 2010.
- YANG, L.; HU, X.; XU, L. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. **Tumour Biology.** v.33, 1445-1454, 2012.
- ZANROSSO, C.W. et al. The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. **Leukemia Research.** v. 30, n.4, p. 477-481, 2005.
- ZEJNICOVIC, J. et al. T. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics.** v.189, p.1-4, 2009.
- ZELKO, I.N. ; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology Medical.** v.33; p.337-349, 2002.

ANEXOS

Anexo 1- Email de resposta a submissão do manuscrito do Editor da Revista Plos One.

----- Forwarded message -----

From: **PLOS ONE** <no-reply@editorialmanager.com>

Date: 2014-06-27 4:47 GMT-03:00

Subject: PLOS ONE Decision: Revise [PONE-D-14-21243] - [EMID:208b04ee77f9251d]

To: Ivana Beatrice Mânicá Cruz <ivanadacruz@gmail.com>

PONE-D-14-21243

Impact of the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells on the cytotoxic response to methotrexate

PLOS ONE

Dear Prof Cruz,

Thank you for submitting your manuscript to PLOS ONE. After careful consideration, we feel that it has merit, but is not suitable for publication as it currently stands. Therefore, my decision is "Major Revision."

We invite you to submit a revised version of the manuscript that addresses the reviewers' comments.

We encourage you to submit your revision within forty-five days of the date of this decision.

When your files are ready, please submit your revision by logging on to <http://pone.edmgr.com/> and following the Submissions Needing Revision link. Do not submit a revised manuscript as a new submission. Before uploading, you should proofread your manuscript very closely for mistakes and grammatical errors. Should your manuscript be accepted for publication, you may not have another chance to make corrections as we do not offer pre-publication proofs.

If you would like to make changes to your financial disclosure, please include your updated statement in your cover letter.

In addition, when submitting your revision please include the following items:

- A rebuttal letter that responds to each point brought up by the academic editor and reviewer(s). This letter should be uploaded as a 'Response to Reviewers' file.

- A clean revised manuscript as your 'Manuscript' file.

- A marked-up copy of the changes made from the previous article file as a 'Revised Manuscript with Track Changes' file. This can be done using 'track changes' in programs such as MS Word and/or highlighting any changes in the new document.

For more information on how to upload your revised submission, see our video: <http://blogs.plos.org/everyone/2011/05/10/how-to-submit-your-revised-manuscript/>

If you choose not to submit a revision, please notify us.

Yours sincerely,

Jian Jian Li, M.D., Ph.D.
Academic Editor
PLOS ONE