

# EFEITO DA CISPLATINA NA LINHAGEM CELULAR HUMANA DERIVADA DE CARCINOMA DE PULMÃO DE NÃO PEQUENAS CÉLULAS NCI-H460

Laura Freitas<sup>1</sup>, Ivana Grivicich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Medicina, Iniciação Científica PROBIC/FAPERGS no Laboratório de Biologia do Câncer, ULBRA; <sup>2</sup>Professora do Curso de Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Coordenadora do Laboratório de Biologia do Câncer, ULBRA

## Introdução

O câncer de pulmão é o responsável pelo maior número de mortes por câncer. Entre os subtipos de câncer de pulmão, o carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC) constitui mais de 80% de todos os casos de câncer de pulmão. A cisplatina ou cis-diaminodichloroplatina (II) (CDDP) é o agente quimioterapêutico mais usado no tratamento de CPNPC, porém o uso clínico deste fármaco está limitado pelo seu efeito tóxico, além do desenvolvimento de resistência. Portanto, o entendimento das respostas celulares frente à exposição a esse agente antineoplásico é de extrema importância.

## Objetivos

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do tratamento com CDDP na linhagem celular de CPNPC humano NCI-H460 em monocamada e esferoides.

## Métodos

Foi utilizada a linhagem celular de CPNPC humano NCI-H460, mantida com meio de cultura Dulbeccos modificado por Eagle suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Os esferóides foram preparados a partir de adaptações do método descrito por Yuhas et al. (1977). Para a mensuração, os esferóides foram fotografados antes do tratamento com a CDDP, após 48 horas de tratamento e em seguida, a cada três dias até os esferóides se desintegrarem.

A citotoxicidade aguda foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT 3 × 10<sup>4</sup> células foram inoculadas em microplacas de 96 poços e submetidas aos tratamentos com diluições seriadas (0 - 10,0 µg/mL) de CDDP por 48 hs. A partir do perfil de dose-resposta foi derivado o valor de IC<sub>50</sub>.

A mutagenicidade foi avaliada pelo teste de *micronúcleo com bloqueio da citocinese* (CBMN). Após coloração analisadas em 1000 X usando um microscópio óptico. Micronúcleos (MN) foram pontuados de acordo com Fenech (2000).

A avaliação da expressão gênica realizada através da extração do RNA de acordo com procedimento padrão à base de sílica (Boom et al., 1990). A expressão dos genes foi quantificada utilizando StepOnePlus™ Real-Time PCR System.

## Resultados

Na caracterização do efeito agudo da CDDP a linhagem celular NCI-H460 apresentou citotoxicidade com valor de IC<sub>50</sub> de 0,11 ± 0,02 µg/mL. Quando comparado ao controle não tratado, a dose de 0,1 µg/mL reduziu a fração de sobrevivência em aproximadamente 30%. Esse efeito foi mais pronunciado com as doses de 0,2 µg/mL (50%), 0,5 µg/mL (60%) e 1,0 µg/mL (70%). Já, com a dose de 5,0 µg/mL de CDDP não foi observada formação de colônias na linhagem celular NCI-H460. Assim, podemos dizer que o comportamento da linhagem celular NCI-H460 frente ao tratamento com CDDP no efeito tardio foi semelhante ao efeito agudo.

A exposição ao agente promoveu uma diminuição do crescimento dos esferóides dependente da dose utilizada. As análises revelaram uma inibição significativa (p < 0,05) do volume dos esferóides em relação ao controle, o qual não recebeu tratamento com CDDP, a partir do oitavo dia de cultura. No oitavo dia, com a dose de 0,1 µg/mL o volume dos esferóides reduziu em aproximadamente 50%, quantidade de agente semelhante a encontrada quando cultivada em monocamada. Quando expostos a dose de 2,0 µg/mL, já após 48 h de exposição à CDDP, não foi observado crescimento dos esferóides (Figura 1).

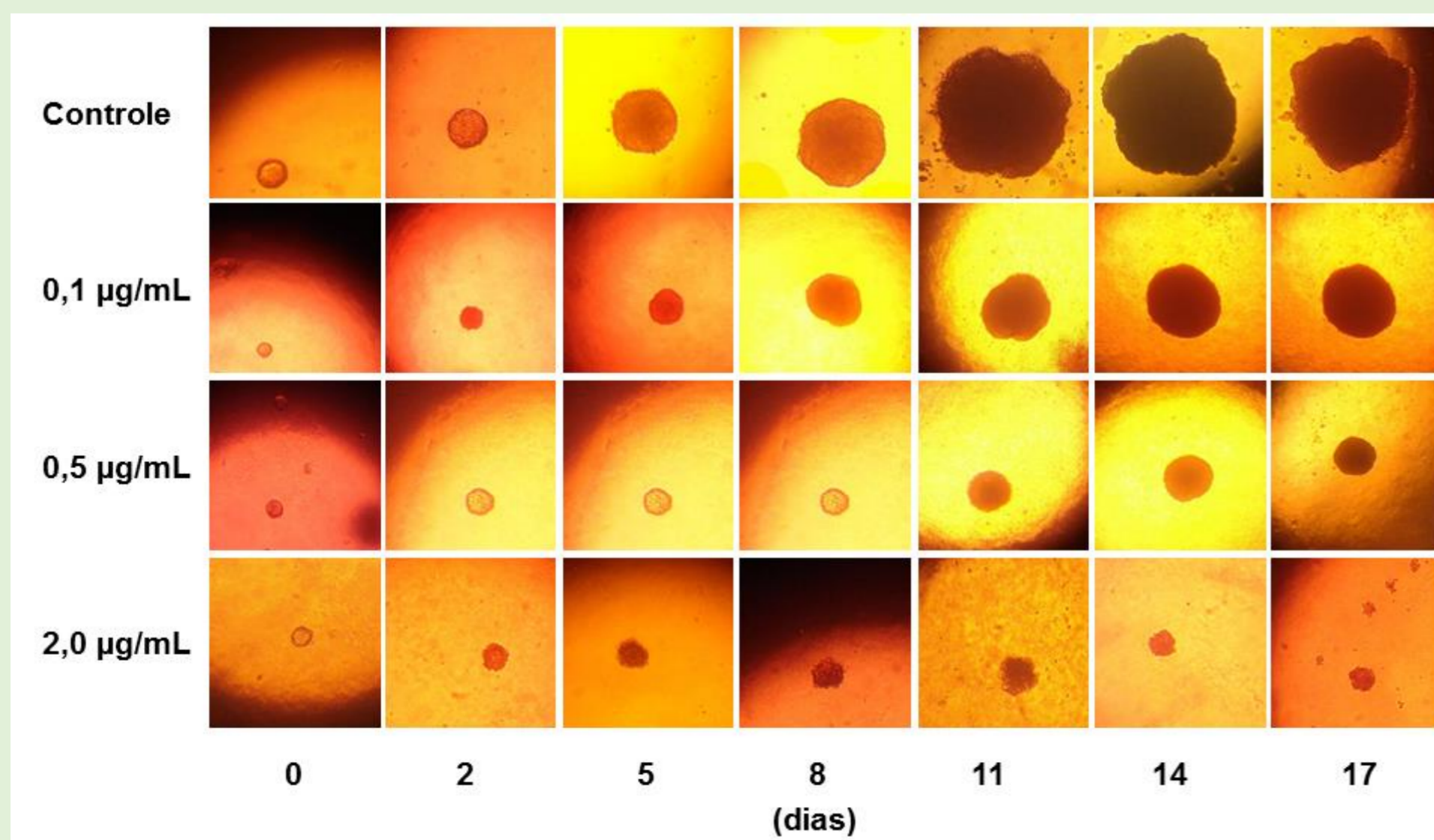


Figura 1: Fotomicrografia representativa de esferóides do grupo controle e tratamentos com 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 2,0 µg/mL de CDDP durante 17 dias em cultura. Aumento 40x.

Foi detectado um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleo após 48 h de exposição a 0,1 µg/mL de CDDP. Nas demais concentrações analisadas não foi observado aumento significativo de micronúcleo. Nas demais concentrações analisadas não foi observado aumento significativo de micronúcleo (Figura 2).

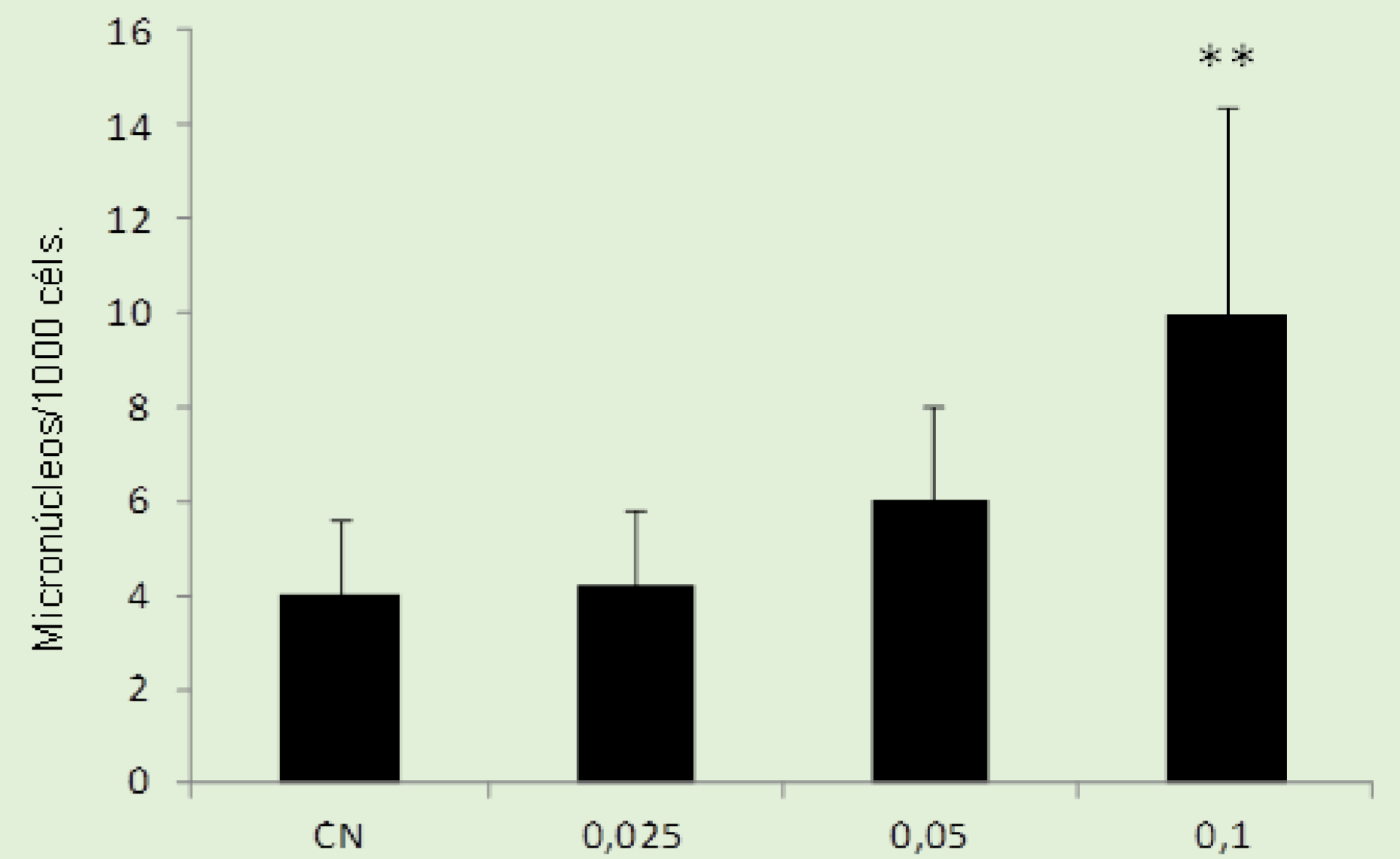


Figura 2: Efeito da exposição das células de CPNPC a CDDP (0,025 – 0,1 µg/mL) sobre as frequências de células binucleadas com MN. Diferença significativa (One-way ANOVA e teste post-hoc de Dunnett) é indicada por \*\*p < 0,01. (CN = controle negativo).

O gene *BIRC5* é um gene anti-apoptótico que codifica a proteína survivina e atua inibindo as caspases. Após tratamento com CDDP, foi observado uma redução da expressão do *BIRC5* dose-dependente na linhagem NCI-H460 quando cultivada em monocamada. No cultivo em esferóides não foi possível analisar esse gene, visto que ele não amplificou no grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Alterações na expressão dos genes *BIRC5* após exposição da linhagem celular NCI-H460, cultivada em monocamada, a cisplatina (0,1-10,0 µg/mL) por 48 h. Os resultados (expressos como média ± desvio padrão) foram calculados a partir de 3 experimentos utilizando o algoritmo 2<sup>-ΔΔCT</sup>.

Gene	Dose de Cisplatina (µg/mL)	Expressão Relativa
<b>BIRC5</b>	0,1	0,98 ± 0,17
	0,2	0,98 ± 0,23
	1,0	0,42 ± 0,10*
	2,0	0,07 ± 0,05**
	10,0	0,05 ± 0,02**

O asterisco(\*) indica diferença significativa entre os grupos tratados com CDDP e o controle não tratado (Teste t de Student: \* p < 0,05; \*\* p < 0,001).

## Conclusão

Diante desses achados concluímos que a CDDP na linhagem celular de câncer de pulmão NCI-H460: 1) possui efeito citotóxico, dependente de dose, em modelo de cultivo de monocamada e em esferóides, sendo este efeito semelhante nos dois modelos; 2) foi capaz de induzir micronúcleos, na concentração de 0,1 µg/mL, comprovando, seu efeito mutagênico, o que pode ser um mecanismo importante no desenvolvimento da toxicidade deste fármaco; 3) em 48 h de exposição induziu alteração na expressão do gene relacionado a apoptose, *BIRC5*, levando a uma redução dose-dependente da expressão e consequentemente sensibilizando as células tumorais à quimioterapia.

Apoio:

