

Introdução e Objetivos

A quimioterapia é uma das principais estratégias terapêuticas para o câncer, contudo algumas vezes os tumores podem apresentar resistência tornando o tratamento ineficiente. Entre os mecanismos responsáveis por esse perfil um dos mais estudados é o aumento do efluxo da droga pelas proteínas de membrana (proteínas ABC). Existem, ainda, outras características associadas a esse perfil, como alteração na expressão da enzima alvo e em enzimas de reparo de DNA, uma vez que essas removem a lesão antes dela se tornar citotóxica. Em relação ao reparo de DNA, a via por excisão de nucleotídeos (NER) é uma das mais versáteis e estudos mostram seu envolvimento no reparo de lesões causadas por inibidores de Topoisomerase II (TopoII), como a Mitoxantrona (MXT) e o Etoposídeo (ETO). Deste modo, o objetivo do trabalho é avaliar a contribuição de mecanismos de resposta ao dano no DNA, com ênfase na atuação da via NER, na resistência à Mitoxantrona da linhagem celular HL-60/MX2.

Métodos e Resultados

Linhagens celulares: Leucemia Promielocítica Aguda:

| Linhagem celular | Característica |
|------------------|-----------------------------------|
| HL-60 | Sensível ao tratamento com MXT. |
| HL-60/MX2 | Resistente ao tratamento com MXT. |

As linhagens celulares foram adquiridas da ATCC. O cultivo foi realizado em meio RPMI com 10% de SBF, em uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37° C.

HL-60/MX2 é resistente a inibidores de Topoisomerase II

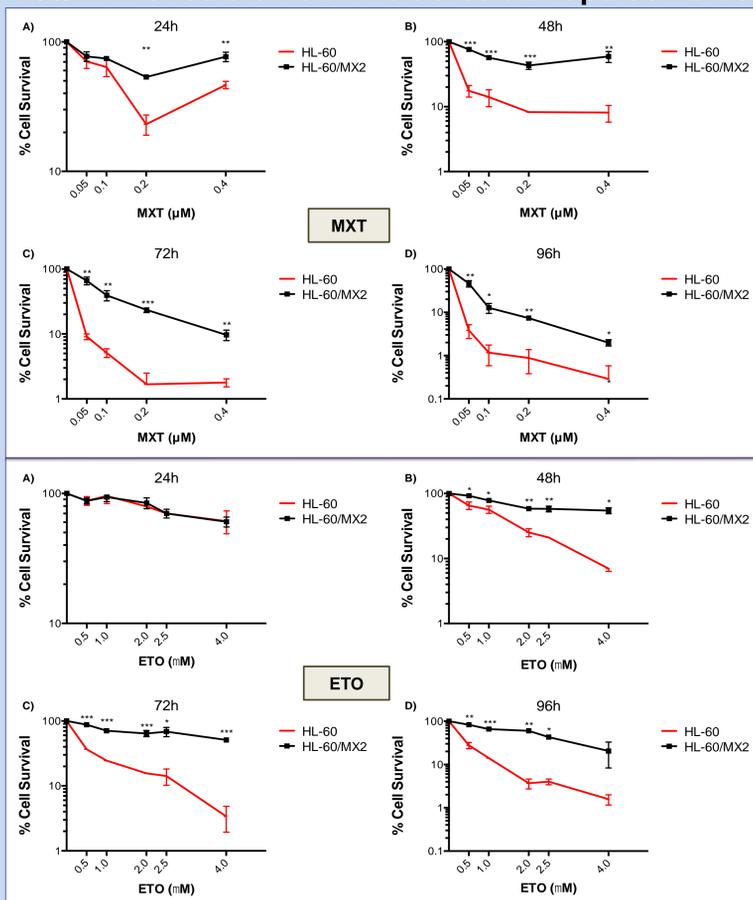


Figura 1. As células foram expostas a diferentes concentrações e tempos de tratamento com MXT e ETO. A viabilidade celular foi determinada através do método de exclusão por Azul de Tripán. Todos resultados foram realizados em triplicata e a análise estatística foi feita pelo programa Prism 5.0 utilizando teste T, sendo considerado significativo um $p < 0,05$.

A distribuição de ciclo celular é diferente entre HL-60 e HL-60/MX2

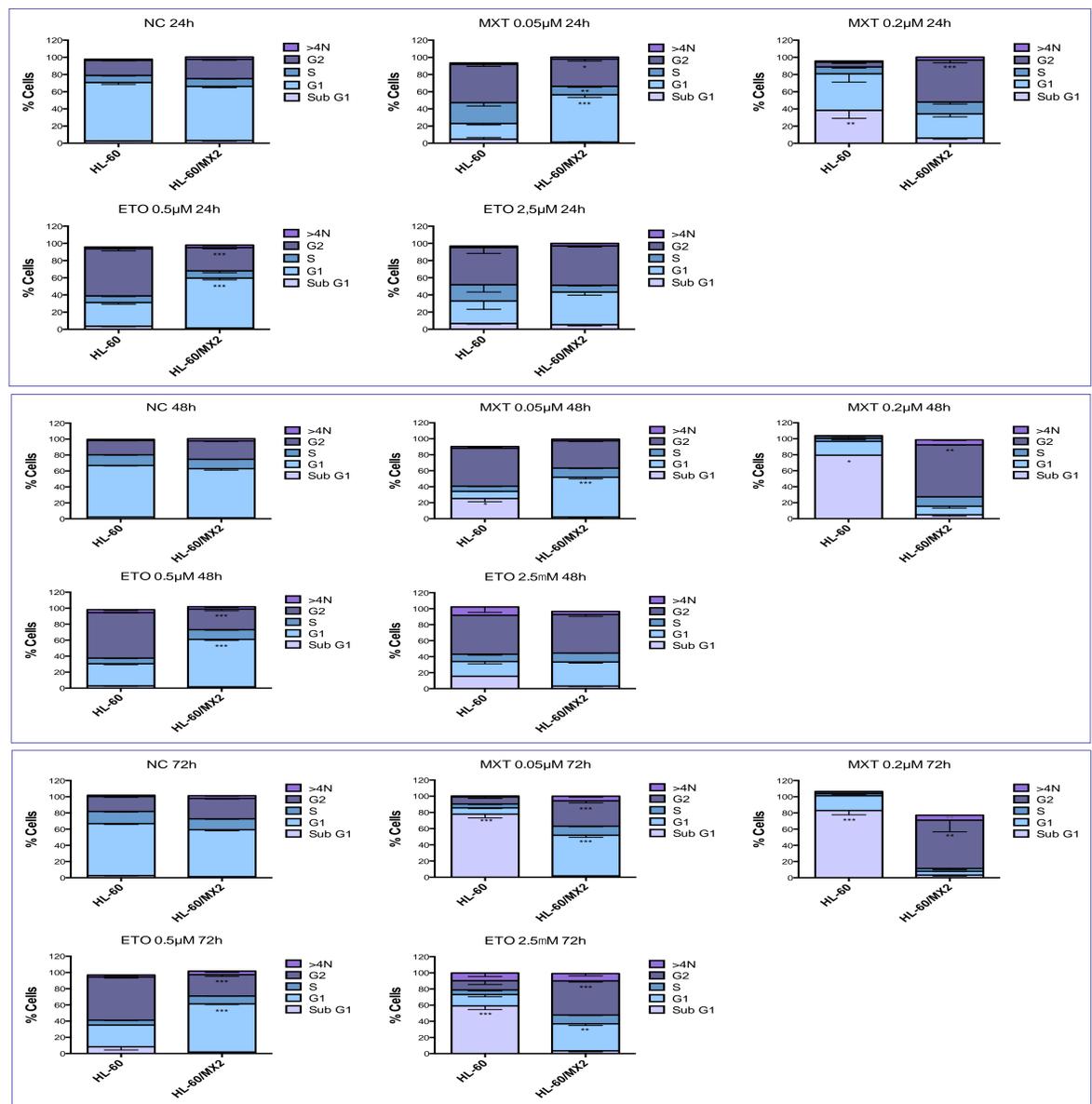


Figura 2. Análise do perfil de ciclo celular diante do tratamento com MXT e ETO. As células foram tratadas por diferentes tempos e o perfil de ciclo celular foi determinado por citometria de fluxo utilizando a marcação com Iodeto de Propídeo. Os resultados foram realizados em triplicata, e as fases do ciclo celular foram comparadas entre as linhagens por ANOVA de uma via seguida do pós-teste Tukey (* $p < 0,05$; **/ $p < 0,001$).

HL-60/MX2 não apresenta sinalização dano por γ H2AX em 2h

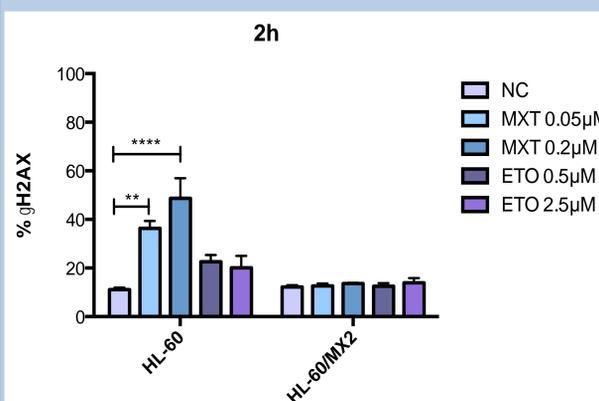


Figura 3. Avaliação da fosforilação de H2AX (γ H2AX) após tratamento com MXT e ETO. As células foram tratadas e analisadas por citometria de fluxo depois de 2h de tratamento. Os resultados apresentados foram realizados em triplicata e analisados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. (**/ $p < 0,001$).

Menor expressão de TopoII α e maior expressão de genes da via NER podem estar associados a resistência da HL-60/MX2

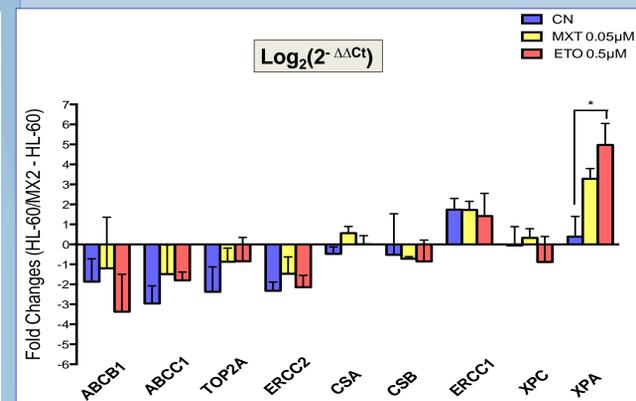


Figura 4. Análise da expressão de mRNA de genes de interesse depois de 2h de tratamento com MXT e ETO por RTq-PCR. Os resultados foram sintetizados em um gráfico de fold changes em uma escala logarítmica de (RQ) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ entre as linhagens HL-60/MX2 e HL-60. A análise estatística foi por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. (* $p < 0,05$; **/ $p < 0,001$).

Conclusão

Os resultados apontaram que HL-60/MX2 apresenta perfil de ciclo celular dose-dependente e fosforilação de H2AX diferente de HL-60. Além disso, as análises de expressão de mRNA (qPCR) mostram que as bombas de efluxo analisadas, glicoproteína P e MRP1, não são responsáveis pela resistência a inibidores de Topoisomerase II, enquanto que a menor expressão de TopoII α e a maior expressão de XPA e ERCC1 podem estar influenciando neste perfil. Entretanto, mais ensaios são necessários para elucidar o mecanismo molecular da resistência a estas drogas.