

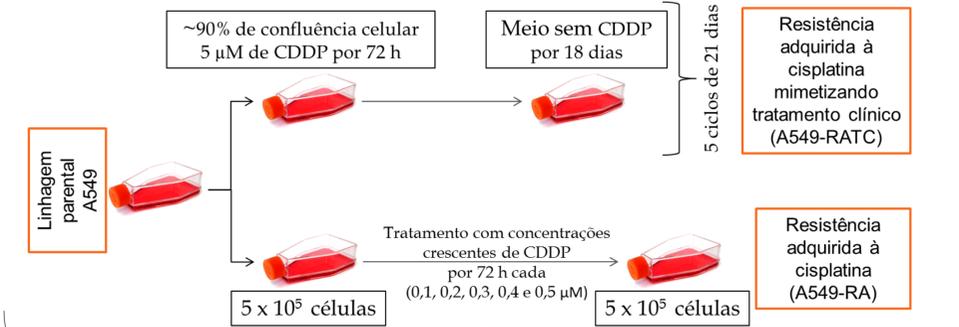
Introdução

Câncer de pulmão é o segundo tipo de câncer mais prevalente no mundo e a principal causa de mortes relacionadas ao câncer, com a maioria dos pacientes apresentando a doença avançada no momento do diagnóstico¹. O tratamento padrão da doença avançada consiste na quimioterapia com agentes alquilantes derivados de platina, sendo a cisplatina (CDDP) o mais comumente utilizado. Contudo, a alta incidência de resistência tumoral à cisplatina limita o sucesso do tratamento com essa droga². Portanto, estudos de processos moleculares envolvidos na resistência à cisplatina em câncer de pulmão podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é o cultivo e desenvolvimento de modelos celulares sensíveis e resistentes à cisplatina para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência à droga no câncer de pulmão.

Metodologia

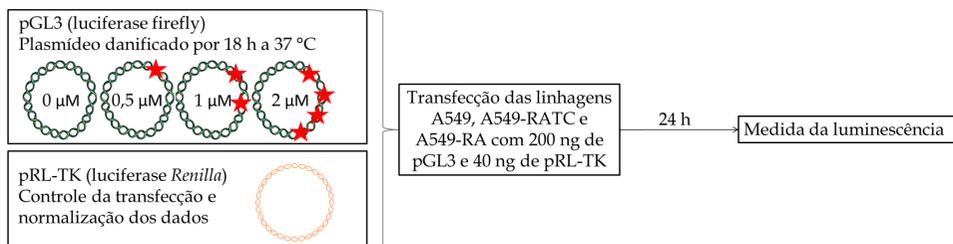
➤ Modelos celulares de resistência à cisplatina desenvolvidos a partir da linhagem parental A549, estabelecida como sensível à cisplatina

➤ As linhagens celulares foram mantidas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino com 100 I.U./mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina 1X a 37°C e 5% de CO₂.

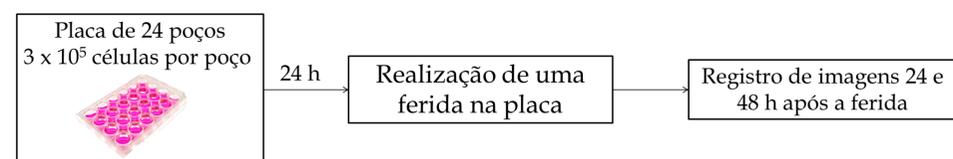


➤ Ensaio de Sulforodamina B (SRB)³: Análise de citotoxicidade da cisplatina. A partir do ensaio de SRB é obtido o valor da concentração de cisplatina para inibição de 50% do crescimento celular (GI₅₀).

➤ Ensaio de Reativação pela Célula Hospedeira⁴ (HCR, Host Cell Reactivation).



➤ Ensaio de wound healing: análise da taxa de migração celular das linhagens.



➤ Análise proteômica: extração e digestão de proteínas pelo método FASP (Filter Aided Sample Preparation) e análise dos peptídeos por espectrometria de massas.

Resultados e discussão

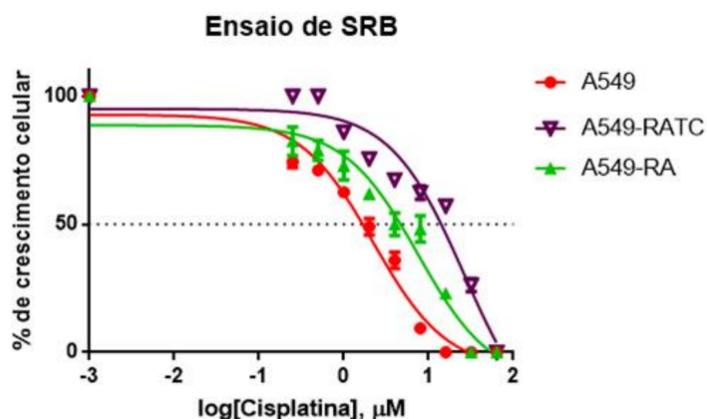


Figura 1: Ensaio de SRB com as linhagens A549, A549-RA e A549-RATC. Curvas representativas do ensaio de SRB das linhagens celulares A549 (GI₅₀ = 4,5 µM), A549-RATC (GI₅₀ = 26,4 µM) e A549-RA (GI₅₀ = 16 µM).

O GI₅₀ das linhagens A549-RATC e A549-RA foram, respectivamente, 3 e 6 vezes maior que a linhagem A549. Os protocolos utilizados para o desenvolvimento das linhagens resistentes e os níveis de resistência obtidos sugerem modelos clinicamente relevantes. Acredita-se que esses modelos celulares possam simular os mecanismos que ocorrem durante o tratamento clínico do câncer⁵.

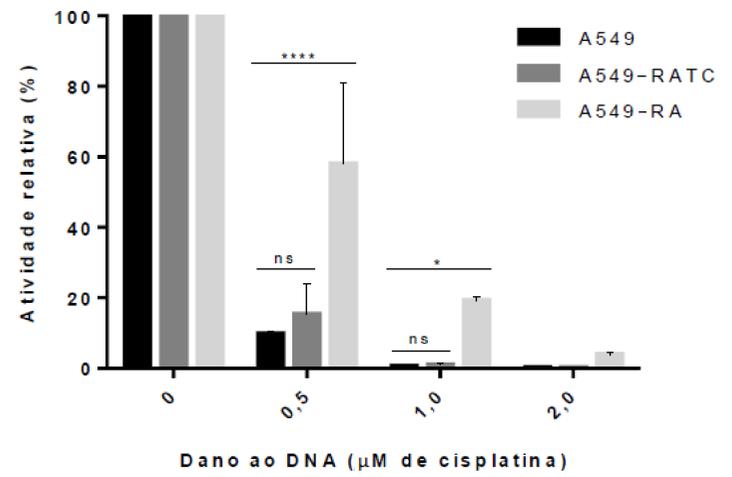


Figura 2: Atividade de reparo do DNA nas linhagens A549, A549-RATC e A549-RA. Atividade relativa de reparo ao dano no DNA das linhagens sensível e resistentes à cisplatina. A estatística utilizada foi ANOVA com comparações múltiplas de Tukey, apresentando significância de p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,0001 (****) ou não significativo (ns).

Os resultados do ensaio de HCR indicaram que a linhagem resistente A549-RATC se assemelha às células parentais A549, apresentando menores níveis de atividade de luciferase quando comparadas às células resistentes A549-RA nas concentrações de 0,5 e 1 µM cisplatina (Figura 2). Esse resultado sugere que o reparo de DNA é um dos possíveis mecanismos envolvidos na resistência à cisplatina apresentada pelas células A549-RA. É possível que as células A549-RA tenham apresentado maior reparo ao dano no DNA por já terem contato com a cisplatina e a ativação prévia de diversos mecanismos de reparo ao DNA já descritos na literatura⁶.

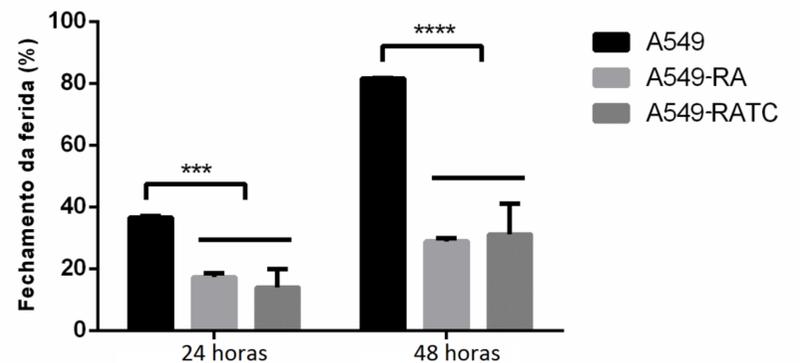


Figura 3: Taxa de migração das linhagens celulares A549, A549-RATC e A549-RA. A taxa de migração foi avaliada em células sensíveis e resistentes à cisplatina pelo método wound healing. A estatística utilizada foi ANOVA, apresentando significância de p ≤ 0,001 (***) e p ≤ 0,0001 (****). O experimento foi realizado em triplicata.

No ensaio de migração (wound healing), as células A549 apresentaram maior capacidade de recolonização da região onde foi realizada a ferida em ambos os tempos avaliados (24 e 48 h) em comparação com as células A549-RA e A549-RATC. Desta forma, é possível inferir que a capacidade de migração é maior nas células sensíveis do que nas células resistentes a CDDP.

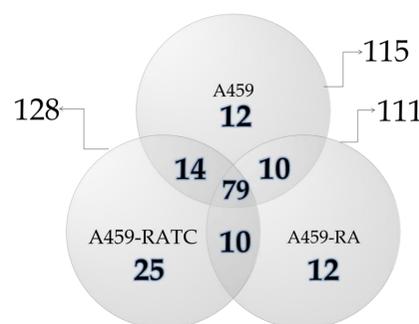


Figura 4: Número de proteínas identificadas na análise proteômica. Representação do número de proteínas totais, exclusivas e compartilhadas identificadas na análise proteômica.

A análise proteômica identificou 115, 128 e 111 proteínas de A549, A549-RATC e A549-RA, respectivamente. As proteínas diferencialmente expressas foram identificadas em análises par a par e suas ontologias estão sendo determinadas. Algumas ontologias interessantes identificadas foram atividade estrutural, regulação da morte celular, resposta de substâncias orgânicas, atividade de dobramento de proteínas e complexo de ribonucleoproteínas, organização de citoesqueleto e biogênese de componentes celulares.

Perspectivas

Serão realizados novos ensaios proteômicos na tentativa de aumentar o número de proteínas identificadas e ampliar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares potencialmente envolvidos na resistência à cisplatina em câncer de pulmão.

Referências

- JEMAL, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Abr. 2011.
- KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer*, v. 7, n. 8, p. 573-84, ago. 2007.
- VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, v. 1, n. 3, p. 1112-6, 2006.
- TAN, X. *et al.* miR-671-5p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by downregulating FOXM1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, v. 1, n. 1, p. 293-307, 1 maio 2010.
- MCDERMOTT, M. *et al.* In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Frontiers in oncology*, v. 4, p. 40, 2014.
- FLOREA, A.-M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, v. 3, n. 4, p. 1351-1371, 15 mar. 2011.