

## INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é o tipo de neoplasia maligna mais letal, sendo que cerca de 80% dos casos de carcinoma pulmonar são de não-pequenas células (NSCLC). Nessa patologia, diversas fontes endógenas e exógenas de espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuem para um quadro de desbalanço redox, tais como a alta pressão de O<sub>2</sub> e o microambiente inflamatório. Um desbalanço redox também está envolvido no processo de carcinogênese. Além disso, sabe-se que os níveis de ROS modulam fenômenos fisiológicos importantes para a patofisiologia tumoral, tais como proliferação e migração. Entretanto, pouco se sabe sobre o metabolismo redox intracelular em NSCLC. Assim, este projeto buscou investigar uma possível relação entre estresse oxidativo intracelular e agressividade tumoral em quatro linhagens celulares de NSCLC, divididas em dois tipos histológicos (adenocarcinoma – AdC; e carcinoma de células grandes – LCC).

## AGRESSIVIDADE

Para caracterização da agressividade das linhagens de NSCLC utilizadas nesse trabalho, foram estabelecidos dois parâmetros: 1) **Potencial invasivo**, determinado pelo sistema BioCoat® Matrigel Chamber System (Fig. 1 e Tab. 1); 2) **Resistência a quimioterápicos de uso clínico**, determinada pelo respectivo valor de IC<sub>50</sub> (Tab. 1). A partir destes, foi estabelecida uma linhagem mais agressiva para cada subtipo histológico: HOP92 (LCC) e EKVX (AdC).

Tabela 1. Parâmetros de agressividade das linhagens de NSCLC.

Parâmetros	Carcinoma de Célula Grande (LCC)		Adenocarcinoma (AdC)	
	H460	HOP92	A549	EKVX
<b>Invasividade</b>				
Índice de invasão	2.15 ± 0.3	<b>12.48 ± 2.6**</b>	3.70 ± 1.2	<b>19.22 ± 1.8***</b>
<b>Quimiorresistência</b>				
Cisplatina GI <sub>50</sub> (µM)	0.81 ± 0.23	2.53 ± 1.21	3.02 ± 0.06	<b>5.16 ± 0.18**</b>
Carboplatina GI <sub>50</sub> (µM)	30.3 ± 7.5	72.5 ± 43.1	89.7 ± 19.2	164.0 ± 33.3

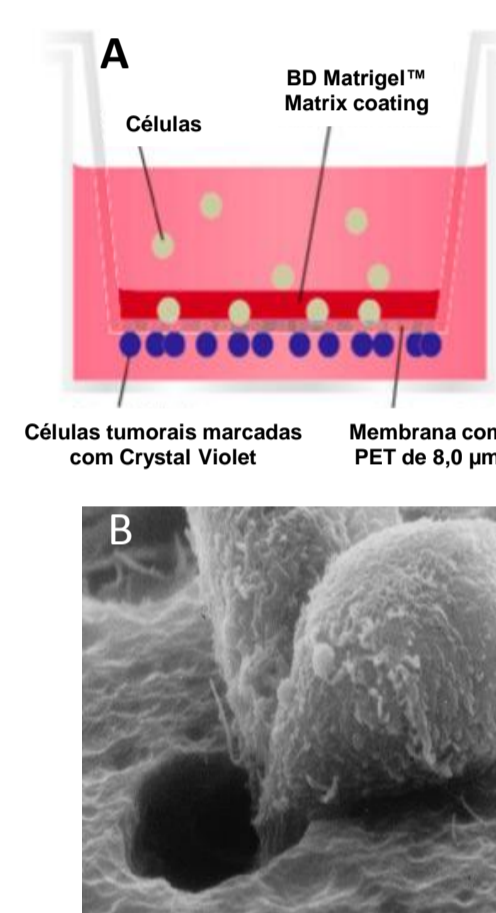


Fig. 1: Ensaio de invasividade realizado com o sistema BioCoat® Matrigel Chamber. A) Representação esquemática do sistema BioCoat® Matrigel Chamber. B) MEV de duas células humanas de fibrosarcoma passando por um poro de 8.0 µm da membrana PET.

## PARÂMETROS REDOX

Para determinar o perfil redox das quatro linhagens utilizadas, os seguintes parâmetros foram analisados:

- 1) A atividade de três enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) (Tab. 2);
- 2) O nível de grupamentos tióis reduzidos (Tab. 2);
- 3) O índice de lipoperoxidação (ensaio de TBARS) (Tab. 2);
- 4) O potencial antioxidante não-enzimático total (Tab. 2);
- 5) A produção endógena de espécies reativas (Fig. 2).

Nossos resultados mostraram que as linhagens mais agressivas apresentam maior estresse oxidativo endógeno e possível acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), no caso das AdC.

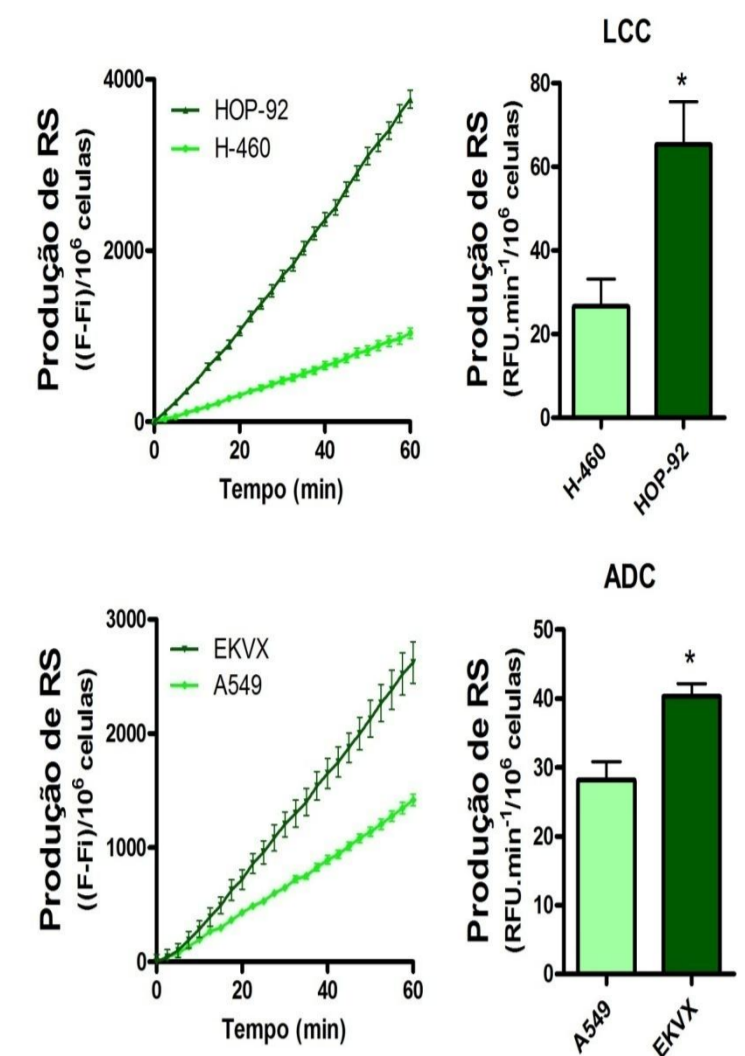


Fig. 2: Produção intrínseca de ROS por quatro linhagens de NSCLC, determinada pela utilização de uma sonda para ROS (DCF). Esquerda: Produção de ROS por minuto por milhão de célula. Direita: Quantificação da área sob a curva dos gráficos da esquerda. \* Significa estatisticamente diferente do seu par (P<0,05).

Tabela 2. Parâmetros enzimático e não-enzimáticos utilizados para determinar o perfil redox de quatro linhagens de NSCLC.

Parâmetros Redox	Carcinoma de Célula Grande (LCC)		Adenocarcinoma (AdC)	
	H460	HOP92	A549	EKVX
<b>Atividade de Enzimas Antioxidantes</b>				
SOD (U SOD/mg)	26.6 ± 3.4	<b>48.8 ± 4.8**</b>	27.7 ± 1.3	<b>33.2 ± 0.7*</b>
CAT (U CAT/mg)	0.25 ± 0.03	<b>1.19 ± 0.24**</b>	<b>1.05 ± 0.10</b>	0.62 ± 0.04**
GPx (U GPx/mg)	0.30 ± 0.05	<b>0.63 ± 0.06*</b>	<b>1.73 ± 0.21</b>	0.89 ± 0.16*
<b>Não-enzimáticos</b>				
Sulfidril (µmol SH/mg)	<b>211 ± 21.6</b>	135 ± 5.3**	<b>250 ± 4.7</b>	194 ± 11.4**
TBARS (nmol eq. MDA/mg)	0.46 ± 0.08	<b>1.04 ± 0.218*</b>	0.43 ± 0.089	<b>1.05 ± 0.078**</b>
TRAP	<b>0.79 ± 0.02</b>	0.49 ± 0.03**	<b>0.73 ± 0.04</b>	0.46 ± 0.07*

## PROLIFERAÇÃO e MIGRAÇÃO

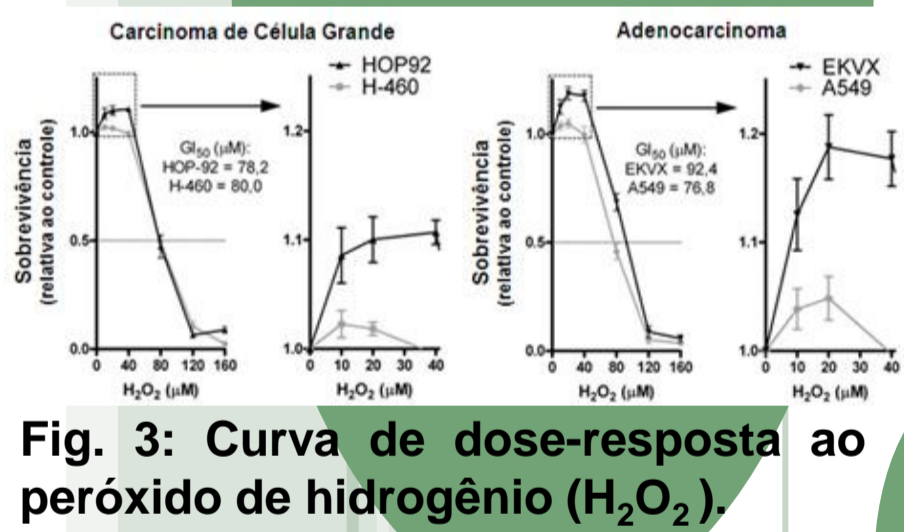


Fig. 3: Curva de dose-resposta ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Para estudar o envolvimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na agressividade tumoral, uma curva de dose-resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi estabelecida para as quatro linhagens de NSCLC (Fig. 3). Nossos resultados mostraram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (< 40µM) estimulou a proliferação, especialmente nas linhagens mais agressivas. Ainda, a remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através da adição de catalase exógena, inibe a proliferação de maneira reversível e dose dependente (Fig. 4), via parada de ciclo celular em fase G1 (efeito citostático) (Fig. 5), bem como reduz o potencial migratório (Fig. 6). Dessa forma, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mostrou essencial para esses processos celulares nas linhagens de NSCLC testadas.

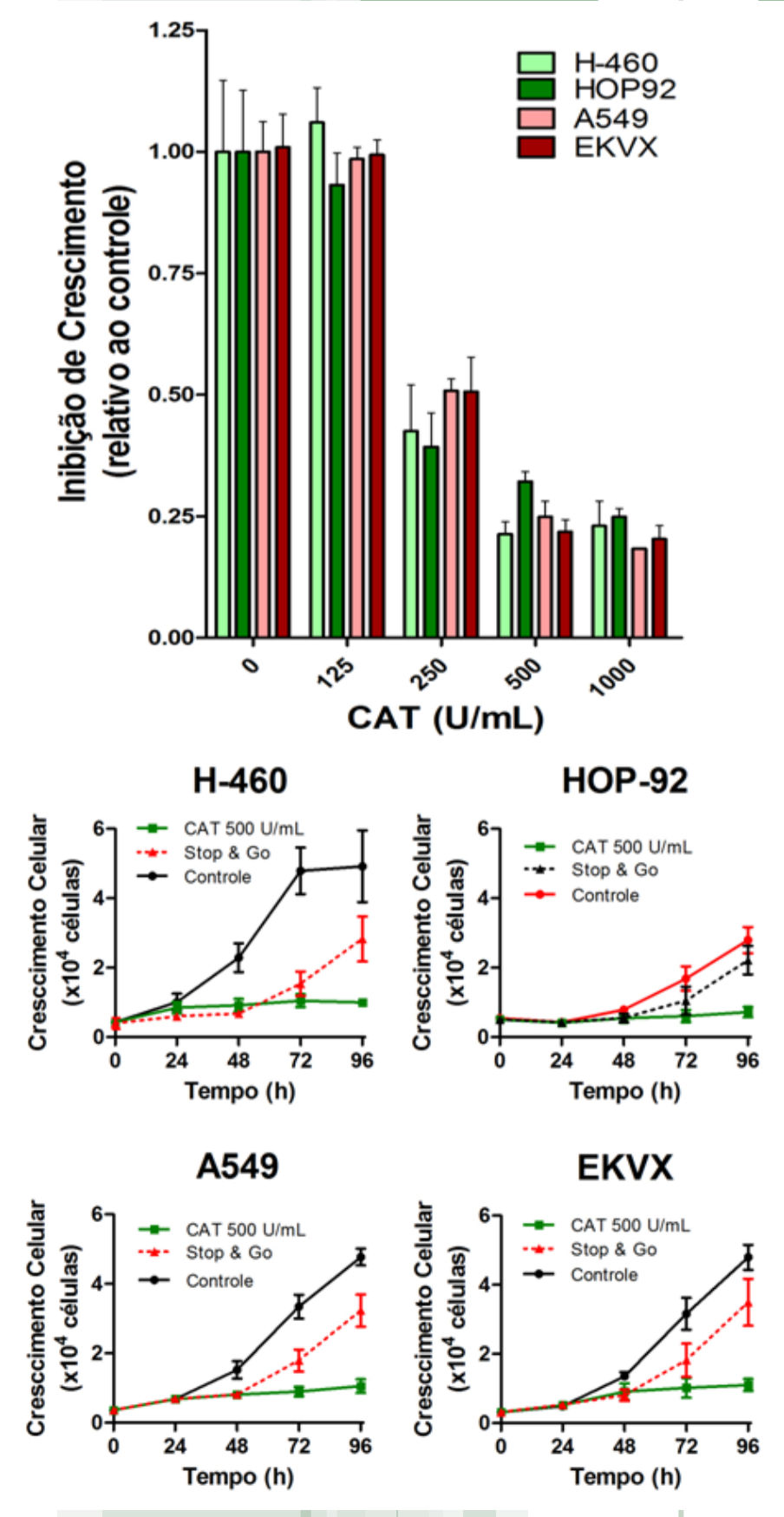


Fig. 4: Inibição de crescimento por adição de catalase exógena. A) Inibição de crescimento após 72h por adição de diferentes concentrações de CAT. B) Curvas de proliferação com CAT. Em verde são as curvas de proliferação na presença de CAT. Em vermelho são as curvas de "stop and go", no qual as células foram tratadas com CAT por 48h, após o meio foi retirado e as células foram mantidas em meio por mais 48h.

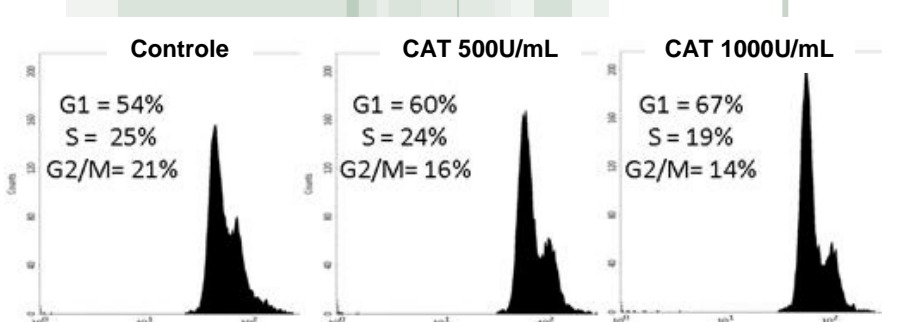


Fig. 5: Citometria de fluxo mostrando parada de ciclo em G1 nos tratamentos com cat.

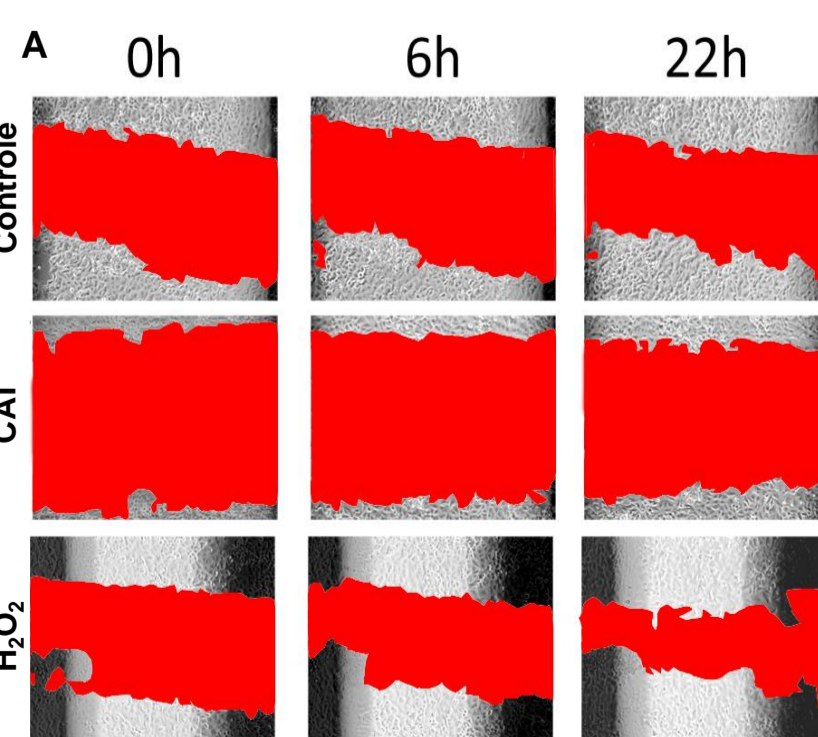
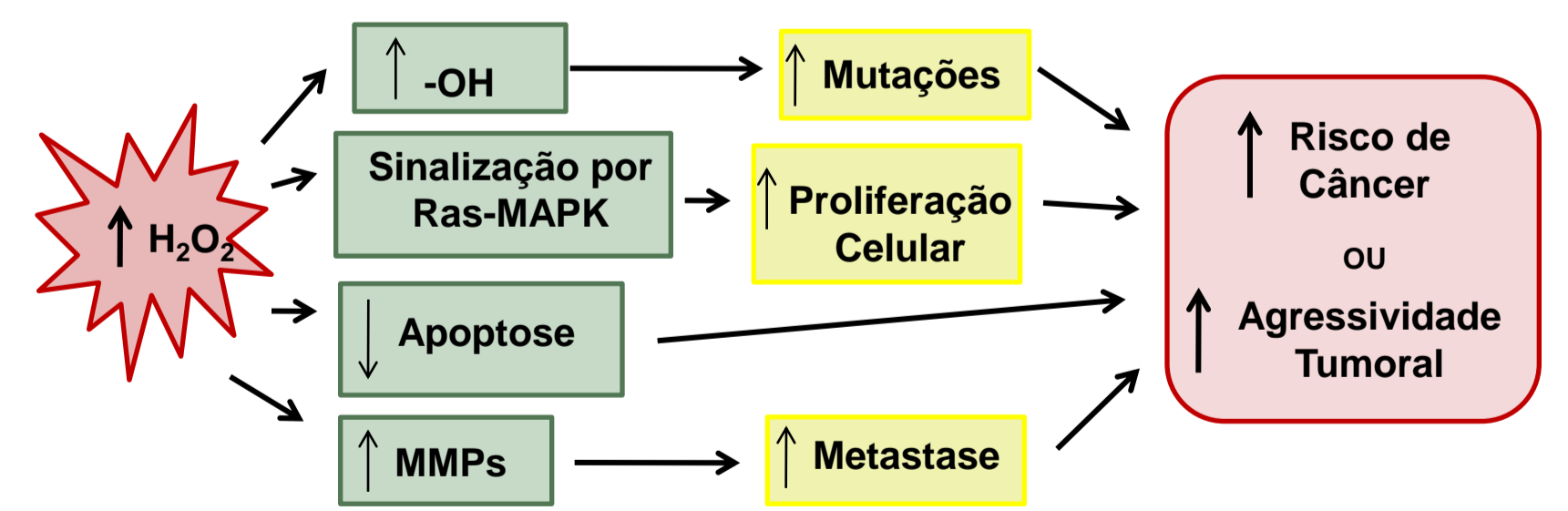


Fig. 6: Ensaio de migração celular na presença de cat ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A) Fotos ilustrando a migração celular. B) Quantificação do espaço livre.

## DISCUSSÃO

Muitos trabalhos relacionaram altos níveis de antioxidantes, especialmente de GSH, com diversas características malignas de células tumorais. Estes afirmam que essas células seriam capazes de evitar a apoptose induzida por estresse oxidativo e a parada de ciclo celular, além de serem resistentes à quimioterapia. Entretanto, já foi demonstrado que um leve aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, está correlacionado com diversos processos fisiológicos, como proliferação, migração e apoptose (Fig. abaixo).



Nossos resultados mostraram que as linhagens mais agressivas possuem um desbalanço redox que favorece o estresse oxidativo. Além disso, a atividade das enzimas antioxidantes analisadas sugere que as células mais agressivas possuem uma maior adaptação a altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular. Portanto, concluímos que o desbalanço redox intracelular em NSCLC pode ser finamente ajustado favorecendo a progressão tumoral. Assim, sugerimos que terapias com antioxidantes podem ser eficazes no tratamento de NSCLC.

## Apoio Financeiro