

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Análise do perfil metabólico e bioenergético de células de adenocarcinoma de pulmão
sensíveis e resistentes à cisplatina

Nathan Araujo Cadore

Porto Alegre, novembro de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E BIOENERGÉTICO DE CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PULMÃO SENSÍVEIS E RESISTENTES À CISPLATINA**

Nathan Araujo Cadore

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
APRESENTADO COMO REQUISITO PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE BACHAREL EM
BIOTECNOLOGIA MOLECULAR PELO INSTITUTO
DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL.

Profa. Dra. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, novembro de 2018

Nathan Araujo Cadore

**ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E BIOENERGÉTICO DE CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PULMÃO SENSÍVEIS E RESISTENTES À CISPLATINA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado
como requisito parcial para obtenção de grau
de Bacharel em Biotecnologia Molecular, pela
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Data de aprovação: ___/___/___

Banca examinadora

Profa. Dra. Karina Mariante Monteiro
Orientadora – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain
Banca – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Diego Bonatto
Banca – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao programa de bolsa institucional, BIC-UFRGS.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não foi feito só por mim, existiram pessoas essenciais no meu caminho para que eu chegasse até aqui. Então aqui estão os meus sinceros agradecimentos.

Primeiro gostaria de agradecer aqueles que me botaram no mundo e desde cedo exigiram o melhor dos meus estudos, os meus pais, Andreia e Edelvan. Em especial a minha mãe que sempre esteve do meu lado em todas as jornadas. Também a minha irmã, Nathália, que segurou todas as pontas quando precisei e toda a minha família que entre uma palavra e outra não me deixaram parar e me incentivaram muito.

O agradecimento também vai para aqueles que eu posso contar em todas as horas, os meus amigos. Obrigado Rita e Camila que participaram de todos os momentos destes últimos anos, rindo nos melhores momentos e me erguendo quando precisei. Aos amigos de dentro e fora da sala de aula, Betina e Lucas, que a biotecnologia me trouxe e desde então andaram do meu lado durante toda a graduação passando pelos mesmos sufocos e sentimentos de vitória.

Agradeço à minha orientadora, Karina, que me deu a chance de entrar para o grupo desde muito cedo, apostando em mim, um aluno do primeiro semestre com apenas 16 anos e me introduzindo na vida acadêmica. As colegas de laboratório, Cris e Bruna, que me auxiliaram desde a primeira pipetagem até a conclusão deste trabalho. Obrigado a todas vocês pela paciência, apoio e ensinamentos. Agradeço a todos os colegas dos laboratórios 204, 206 e 210 que sempre foram solícitos comigo. Também, ao Prof. Fábio Klamt que proporcionou as análises com OROBOROS Oxygraph-2K e a Camila que me ajudou durante todos os experimentos.

RESUMO

O câncer de pulmão é o segundo tipo de câncer mais prevalente no mundo e a principal causa de mortes pela doença. O tratamento padrão para pacientes com câncer de pulmão consiste na quimioterapia com agentes como a cisplatina (CDDP). Porém, a alta incidência de resistência tumoral à CDDP limita o sucesso do tratamento. Diversos estudos têm utilizado modelos celulares para o entendimento de mecanismo moleculares envolvidos na resistência do câncer a CDDP. Células tumorais podem mudar e adaptar as suas necessidades metabólicas e/ou bioenergéticas dependendo do microambiente e de suas estratégias de sobrevivência. Portanto, entender melhor o perfil metabólico e energético adotado por células sensíveis e resistentes à CDDP pode auxiliar na identificação de proteínas e vias celulares ativadas na sobrevivência celular durante a quimioterapia. Nesse trabalho, foram desenvolvidas sublinhagens celulares com resistência adquirida à CDDP (A549-RA), a partir da linhagem parental de adenocarcinoma de pulmão A549. As células A549-RA foram desenvolvidas a partir da exposição das células parentais a concentrações crescentes de CDDP (0,1-0,5 μM). Após, foram estudados parâmetros metabólicos e bioenergéticos das células sensíveis e resistentes à CDDP. O efeito de moléculas e substratos no crescimento celular foi analisado por ensaio clonogênico ou de proliferação celular. Análises de respirometria de alta resolução foram realizadas em OROBOROS Oxygraph-2K. As células A549-RA apresentaram valor médio de GI_{50} (concentração de cisplatina necessária para inibição de 50% do crescimento) de $\sim 3 \mu\text{M}$, enquanto as células A549 apresentaram GI_{50} de $0,4 \mu\text{M}$. Os níveis de resistência apresentados sugerem que os modelos celulares gerados são clinicamente relevantes, pois apresentam valores de GI_{50} 8 vezes maiores do que aqueles das células sensíveis, resultado semelhante ao encontrado em células de pacientes após o tratamento quimioterápico. As células A549 apresentaram maior taxa de crescimento quando comparadas com as células A549-RA na ausência de CDDP. Porém, na presença da droga as células A549 perdem essa vantagem proliferativa, enquanto o crescimento das células A549-RA não é afetado. As células não tiveram o seu crescimento afetado pela presença de moléculas antioxidantes, sugerindo que espécies reativas de oxigênio não estão interferindo no seu crescimento. As linhagens não apresentaram diferença entre si quando a dependência de glutamina, sendo ambas dependentes deste aminoácido. As células A549-RA se mostraram mais sensíveis à privação de glicose do que as células A549. Os dados de respirometria indicaram um perfil bioenergético semelhante entre as células sensíveis e resistentes à CDDP, com maior consumo de oxigênio residual nas células A549-RA. Dessa forma, os dados indicam que as células

A549-RA adaptaram o seu metabolismo ao ambiente citotóxico adotando um *trade-off* de crescimento lento não associado ao estresse oxidativo. A maior dependência de glicose e a similaridade nos parâmetros de respiração mitocondrial permitem propor um aumento na glicólise para obtenção de energia pelas células A549-RA.

ABSTRACT

Lung cancer is the second most prevalent cancer in the world and the leading cause of death. The main treatment for lung cancer patients is chemotherapy using drugs such as cisplatin (CDDP). However, the high incidence of tumor CDDP-resistance limits treatment success. Several studies have used cell lines for the understanding of molecular mechanisms involved in cancer CDDP-resistance. Tumor cells can change and adapt their metabolic and/or bioenergetic needs depending on the microenvironment and its survival strategies. Therefore, a better understanding of the metabolic and energetic profile adopted by CDDP-sensitive and resistant cells may aid in the identification of proteins and metabolic pathways involved in cell survival during chemotherapy. In this study, lung cancer subline with acquired CDDP-resistance (A549-RA) was developed from the parental cell line A549. A549-RA cells were grown from exposure of the parental cells to increasing concentrations of CDDP (0.1-0.5 μM). Afterwards, metabolic and bioenergetic parameters of CDDP-sensitive and resistant cells were studied. The effect of molecules and substrates on cell growth was analyzed by clonogenic or cell proliferation assay. High-resolution respirometry analyzes were performed on OROBOROS Oxygraph-2K. A549-RA cells have shown mean GI_{50} (cisplatin concentration required for 50% growth inhibition) of $\sim 3 \mu\text{M}$ whereas A549 cells had a GI_{50} of $0.4 \mu\text{M}$. The resistance levels presented suggest that the cellular model developed is clinically relevant, since it presents GI_{50} values 8 times higher than those of the sensitive cells, a result similar to that found in patients' cells after chemotherapy treatment. A549 cells had a higher growth rate when compared to A549-RA cells in the absence of CDDP. However, in the presence of the drug, A549 cells lose this proliferative advantage, whereas the growth of A549-RA cells is not affected. The cells did not have their growth affected by the presence of antioxidant molecules, suggesting that reactive oxygen species are not interfering on their growth. The cell lines showed no difference on glutamine dependence between them, both being dependent on this amino acid. A549-RA cells were shown to be more sensitive to glucose deprivation than A549 cells. The respirometry data indicated a similar bioenergetic profile between A549 and A549-RA cell lines, with higher residual oxygen consumption in A549-RA cells. Thus, the data indicate that A549-RA cells adapted their metabolism to the cytotoxic environment adopting a slow-growing trade-off not associated with oxidative stress. The higher glucose dependence and similarity in mitochondrial respiration parameters allow us to propose an increase in glycolysis to obtain energy by A549-RA cells.

SÚMARIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	O câncer	11
1.1.1	O câncer de pulmão	11
1.1.2	Quimioterapia e cisplatina	12
1.2	Proteínas e mecanismos de resistência à cisplatina	13
1.2.1	Modelos celulares para o estudo da resistência à cisplatina	14
1.2.2	Fitness celular, bioenergética e resistência à cisplatina	15
1.3	Justificativa	18
2.	OBJETIVO	19
2.1	Objetivos específicos	19
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Cultura celular e desenvolvimento de resistência	20
3.2	Análise da resistência à cisplatina	20
3.3	Ensaio clonogênico	20
3.4	Ensaio de proliferação celular	21
3.5	Medida de consumo de O ₂ mitocondrial	21
4.	RESULTADOS	23
4.1	Desenvolvimento de sublinhagens celulares resistentes a CDDP	23
4.2	As células resistentes à cisplatina apresentam estratégia celular de máxima sobrevivência (crescimento lento)	23
4.3	Moléculas antioxidantes não impactam o crescimento das células A549 e A549-RA	24
4.4	As células A549-RA são mais sensíveis à privação de glicose	26
4.5	O crescimento das células A549 e A549-RA é igualmente dependente de glutamina	27
4.6	Perfil bioenergético mitocondrial semelhante entre as células A549 e A549-RA e maior quantidade de ROX nas células resistentes a CDDP	29
5.	DISCUSSÃO	31
6.	CONCLUSÃO	35
7.	PERSPECTIVAS	35
8.	REFERÊNCIAS	36

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau Celsius
μL	microlitro(s)
μM	micromolar
A549	linhagem celular imortalizada de adenocarcinoma de pulmão humano
A549-RA	sublinhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano com resistência adquirida à cisplatina
ATP	adenosina trifosfato
CDDP	<i>cis</i> -diaminodicloroplatina, cisplatina
CO₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucleico
GI50	do inglês, 50% of <i>growth inhibition</i>
GSH	glutaciona reduzida
h	hora(s)
HPV	vírus do papiloma humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KCl	cloreto de potássio
KH₂PO₄	fosfato monopotássico
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
Na₂PO₄	fosfato dissódico
NaCl	cloreto de sódio
NSCLC	do inglês, <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
OXPHOS	fosforilação oxidativa
PBS	salina tamponada com fosfato (de phosphate-buffered saline).
ROS	do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>
ROX	do inglês, <i>Residual Oxygen Consumption</i>
RPMI	do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número estimado de incidência e mortalidade do câncer de pulmão em todo o mundo, ambos os sexos, todas as idades, em 2018	11
Figura 2: Diferentes interações da cisplatina com o DNA e suas frequências	13
Figura 3: Mecanismos de resistência à CDDP.....	14
Figura 4: Efeito da quimioterapia nas diferentes estratégias de crescimento celular	16
Figura 5: Gráfico representativo das medidas dos parâmetros de respiração celular realizados	22
Figura 6: Crescimento celular na presença de cisplatina	23
Figura 7: Capacidade clonogênica das células A549 e A549-RA	24
Figura 8: Capacidade clonogênica das células A549 e A549-RA na presença e na ausência de CDDP	24
Figura 9: Ensaio clonogênico na ausência e presença de GSH	25
Figura 10: Avaliação do efeito de moléculas antioxidantes na capacidade clonogênica das células A549 e A549-RA	26
Figura 11: Proliferação das células A549 e A549-RA na presença e ausência de glicose	27
Figura 12: Porcentagem de crescimento celular em relação ao controle na ausência de glicose em 96 h	27
Figura 13: Ensaio clonogênico com diferentes concentrações de L-glutamina	28
Figura 14: Ensaio de proliferação na presença e ausência de L-glutamina	29
Figura 15: Medidas de consumo de O₂ mitocondrial pelas células A549 e A549-RA	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer

O câncer é uma das doenças mais preocupantes nos dias de hoje. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC, <http://gco.iarc.fr/today/home>), estima 18 milhões de novos casos e 9,5 milhões de mortes relacionadas à esta doença apenas no ano de 2018. Além disso, é estimado que estes números continuem crescendo pelo aumento da população e outros fatores como o hábito de fumar e a incidência de HPV (RAHIB *et al.*, 2014). Entre os diferentes tipos de câncer, os mais incidentes no mundo são os de pulmão, mama, próstata e colorretal (TORRE *et al.*, 2015).

1.1.1 O câncer de pulmão

O câncer de pulmão é o tipo de tumor mais incidente em todo o mundo, sendo o líder na causa de mortes relacionadas ao câncer entre homens e o segundo entre as mulheres (Fig. 1). São estimados 1,8 milhões de novos casos de câncer de pulmão por ano em todo o mundo e 1,6 milhões de mortes relacionadas a esta doença (TORRE *et al.*, 2015). Assim como em todo o mundo, o câncer de pulmão é um dos mais incidentes entre os brasileiros e o líder na causa de mortes relacionadas ao câncer (INCA, 2018). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima 18.740 casos novos de câncer de pulmão entre homens e de 12.530 nas mulheres para 2018.

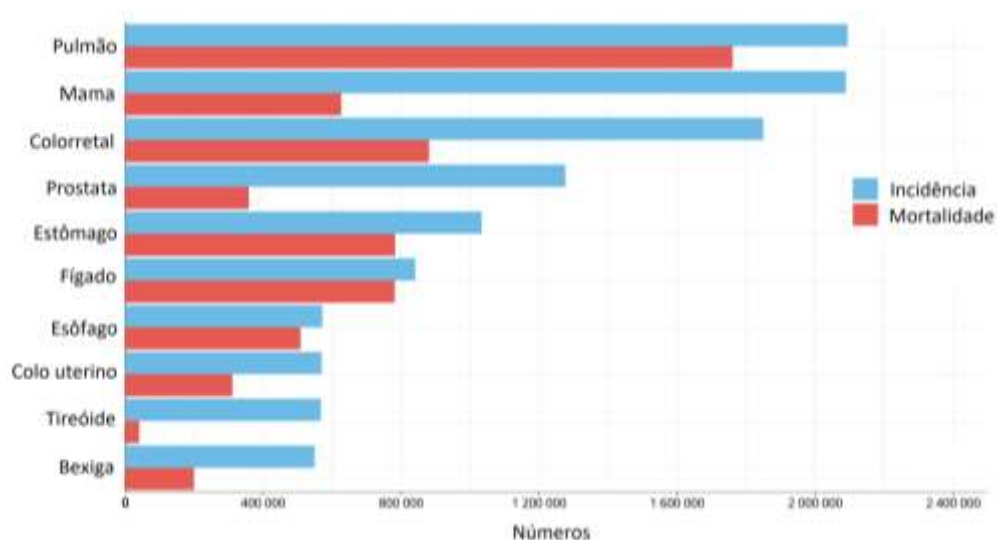


Figura 1: Número estimado de incidência e mortalidade do câncer de pulmão em todo o mundo, ambos os sexos, todas as idades, em 2018. Adaptado de <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars> (acesso em 07/11/2018).

As células de câncer de pulmão têm duas diferentes classificações histológicas: câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês *non-small cell lung cancer*) e câncer de pulmão de células pequenas, sendo o primeiro tipo responsável por 85% dos casos (HAGHGOO *et al.*, 2015). Na maioria dos casos, o câncer de pulmão é descoberto em estágios avançados (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016), sendo inoperável e limitando o sucesso do tratamento. Para estágios mais avançados da doença, o tratamento é baseado em quimioterapia com agentes alquilantes derivados de platina, como a carboplatina e a cisplatina.

1.1.2 Quimioterapia e cisplatina

A cisplatina (CDDP) ou cis-diaminodicloroplatina (II) começou a ser estudada a partir dos anos 1960 quando foi observada a sua capacidade de inibir a divisão celular em *Escherichia coli* (ROSENBERG; VANCAMP; KRIGAS, 1965), criando muito interesse em um possível uso deste produto na terapia contra o câncer. Entre diversas drogas quimioterápicas amplamente usadas contra o câncer, a CDDP é uma das mais estudadas, sendo a primeiro composto derivado de platina para o tratamento contra o câncer aprovado pelo *Food and Drug Administration* em 1978 (KELLAND, 2007). A CDDP é utilizada no tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo os de bexiga, cabeça e pescoço, ovário, testículo e pulmão (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Mas apesar da sua eficácia no tratamento do câncer, os tratamentos à base de platina são efetivos em apenas 30% dos pacientes com NSCLC (SOCINSKI, 2004).

O efeito citotóxico da CDDP é resultado da sua interação covalente com bases purinas do DNA. Estas ligações formam adutos podendo ser intracadeia, na mesma cadeia do DNA, ou intercadeias, entre cadeias diferentes do DNA, mas em menor porcentagem (Fig. 2) (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010). Esta interação impede eventos celulares essenciais como replicação e transcrição do DNA, e, conseqüentemente, afeta a proliferação e sobrevivência celular.

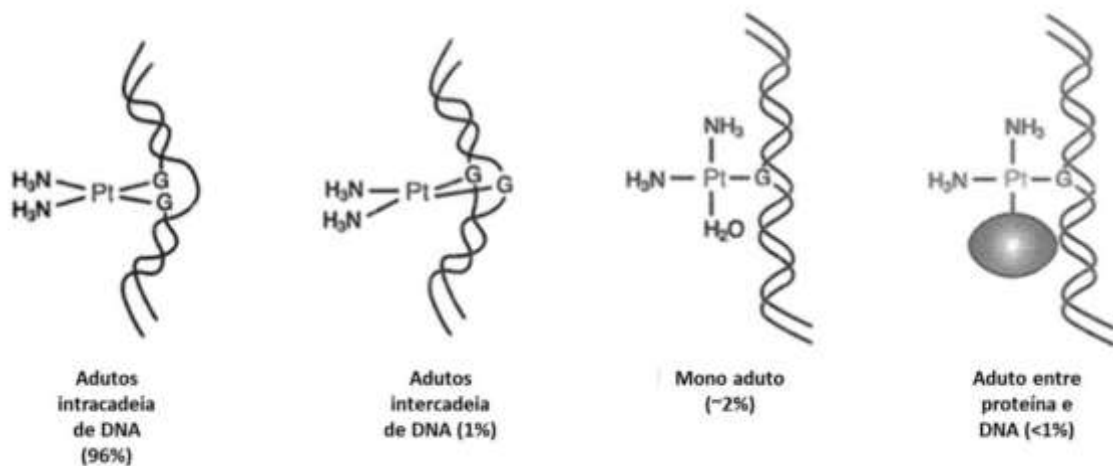


Figura 2: Diferentes interações da cisplatina com o DNA e suas frequências. Adaptado de <http://www.conconilab.ca/wp-content/uploads/2013/05/image-cisplatin-3.jpg> (acesso em 07/11/2017).

1.2 Proteínas e mecanismos de resistência à cisplatina

A resistência à CDDP é um problema relevante no tratamento do câncer de pulmão, pois estes tumores frequentemente apresentam resistência intrínseca ou adquirida ao tratamento com este químico. Em contato com a droga, existe uma mudança no nível de expressão e atividades de um grande número de genes e proteínas, levando a ativação de diferentes vias de sinalização (SIDDIK, 2003). Durante a progressão do câncer, diferentes subclones se desenvolvem ao longo do tempo em resposta ao microambiente ou pressão seletiva seguindo os princípios Darwinianos da evolução (GREAVES; MALEY, 2012). Assim, a heterogeneidade intratumoral é um dos determinantes essenciais para a evolução do câncer durante o tratamento com a droga, e existe um grande número de evidências indicando a presença de subclones resistentes anteriormente ao tratamento (BOZIC *et al.*, 2013).

A resistência celular à cisplatina é um processo molecular complexo e multifatorial. Os mecanismos celulares de resistência conhecidos incluem a redução no acúmulo intracelular da droga, o qual pode estar relacionado com a diminuição da captação da droga, detoxificação por moléculas contendo grupamentos tiol, alterações nas vias de sinalização apoptótica, equilíbrio do balanço redox e o aumento no reparo do DNA (SIDDIK, 2003) (Fig. 3). Para o melhor entendimento destas vias moleculares de resistência à CDDP, modelos de linhagens celulares com resistência à droga podem ser uma alternativa para o estudo e compreensão destes mecanismos.

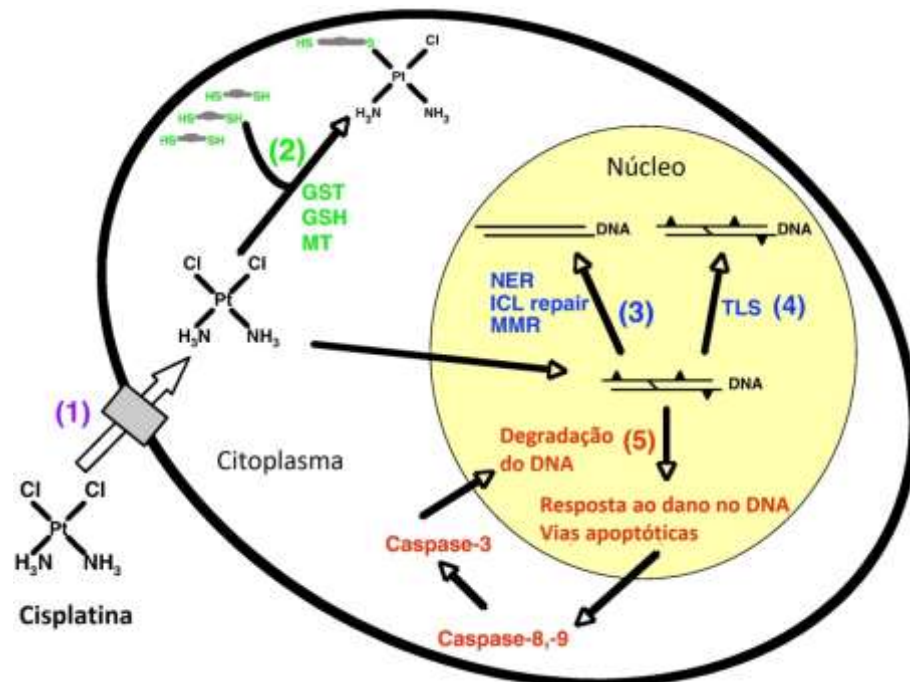


Figura 3: Mecanismos de resistência à CDDP. A resistência a cisplatina é um processo multifatorial podendo envolver aumento no efluxo ou diminuição do influxo da droga (1), detoxificação da CDDP no citoplasma (2), alterações nos mecanismos de reparo do DNA (3, 4) e na eficiência do processo de apoptose (5). Adaptado de Köberle *et al.*, 2010.

1.2.1 Modelos celulares para o estudo da resistência à cisplatina

Modelos celulares são excelentes ferramentas para o estudo da resistência tumoral a quimioterápicos. Uma ampla variedade de linhagens celulares tumorais tem sido utilizada em estudos de resistência a quimioterápicos, incluindo a cisplatina, com destaque para linhagens de câncer de bexiga, cabeça e pescoço, pulmão, ovário e testículo (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). A linhagem A549 de adenocarcinoma de pulmão humano é reconhecida como um bom modelo de estudos para o NSCLC, além de ser amplamente referenciada na literatura para o estudo de resistência a agentes quimioterápicos (CUI *et al.*, 2018; OUYANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

Muitos dos modelos já desenvolvidos utilizam longos períodos de tratamento com a droga e geram níveis de resistência que superam em até 30 vezes aqueles apresentados pela linhagem parental (MCDERMOTT *et al.*, 2014). A vantagem dessas linhagens “super-resistentes” é que elas geram células com resistência estável, de fácil manutenção e estudo. Contudo, esta pode não ser a melhor opção para mimetizar a resistência celular encontrada nos tratamentos clínicos, resultando em um modelo de estudo limitado (GILLET *et al.*, 2011). Assim, modelos celulares gerados pela exposição a menores concentrações da droga e por

menores períodos de tempo são considerados clinicamente relevantes por apresentarem níveis de resistência que se aproximam daqueles encontrados em células tumorais de pacientes após o tratamento quimioterápico (MCDERMOTT *et al.*, 2014).

1.2.2 *Fitness* celular, bioenergética e resistência à cisplatina

Desde a observação feita por Otto Warburg nos anos de 1920 (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011), quando descreveu o metabolismo e bioenergia alterados das células cancerígenas, foram intensificados os estudos no âmbito da metabolômica e da genômica funcional revelando a plasticidade do metabolismo e da bioenergética presente nos tumores. Por isso, a maior conversão de glicose para lactato em ambientes aeróbicos pelas células tumorais é conhecida como efeito Warburg. Nas décadas seguintes, diversos estudos investigaram e comprovaram que, não apenas o metabolismo de glicose é alterado, mas também o de glutamina é modificado para a produção de ATP para a célula tumoral. Estas mudanças de metabolismo podem ser exploradas para a terapia do câncer (ALAM *et al.*, 2016).

Fitness celular pode ser definido como a capacidade de uma célula de prosperar em um determinado ambiente, uma habilidade determinada por vários parâmetros, incluindo a taxa de proliferação celular, a regulação transcricional, a atividade de sinalização e a taxa metabólica (DI GREGORIO; BOWLING; RODRIGUEZ, 2016). Diferenças no *fitness* celular podem conferir vantagens adaptativas para as células sobreviverem em diferentes ambientes, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento e progressão do câncer e sua resistência à quimioterapia (SALGIA; KULKARNI, 2018).

As células de câncer podem assumir duas principais estratégias proliferativas, sendo uma delas a de máximo crescimento (rápida proliferação) e outra de máxima sobrevivência (com menor proliferação que garante maior precisão na replicação do DNA) (STEARNS, 1992). Após o tratamento com o quimioterápico, existe uma seleção destas populações, dando vantagem às células especializadas em sobreviver (Fig. 4). Células com reprodução rápida têm um custo de aumento da mortalidade em ambientes adversos, por isso o menor consumo de ATP para a proliferação celular pode ser uma estratégia de sobrevivência das células tumorais durante a quimioterapia (AKTIPIS *et al.*, 2013). A estratégia de maior sobrevivência e, portanto, de ciclos de vida mais lentos, incluem mecanismos alternativos como supressão de apoptose, aumento no reparo ao dano no DNA, autofagia na falta de nutrientes, uso da revisão das polimerases, remodelamento do microambiente tumoral, melhor detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), e

aumento da captura de recursos, juntamente com sua utilização eficiente pela fosforilação oxidativa (OXPHOS) à custa da proliferação.

Nessa história evolutiva, as células proliferativas crescem a altas taxas, porém às custas de um aumento da mortalidade em ambientes adversos, enquanto as células de crescimento lento têm o benefício de aumentar a sobrevivência sob condições estressantes, como durante o tratamento quimioterápico. AKTIPIIS *et al.* (2013) propõem que esses *trade-offs* são componentes cruciais, mas pouco reconhecidos, da biologia do câncer e que eles têm importantes implicações para a progressão e o tratamento do câncer.

Estudos com tecidos tumorais indicam que a resistência a CDDP pode ser resultado de mudanças epigenéticas em nível celular e molecular. A mudança no nível de expressão de genes envolvidos na maioria dos aspectos da sobrevivência celular, como apoptose, reparo ao dano no DNA, chaperonas, transportadores, ciclo celular, fatores de transcrição, oncogenes, GSH e enzimas relacionadas e proteínas mitocondriais permitem que as células de câncer assumam diferentes estratégias de crescimento. Estas mudanças podem levar as células a seguirem um perfil de máxima sobrevivência, sendo possível relacionar esta característica à resistência a CDDP (Fig. 4) (SHEN *et al.*, 2012).

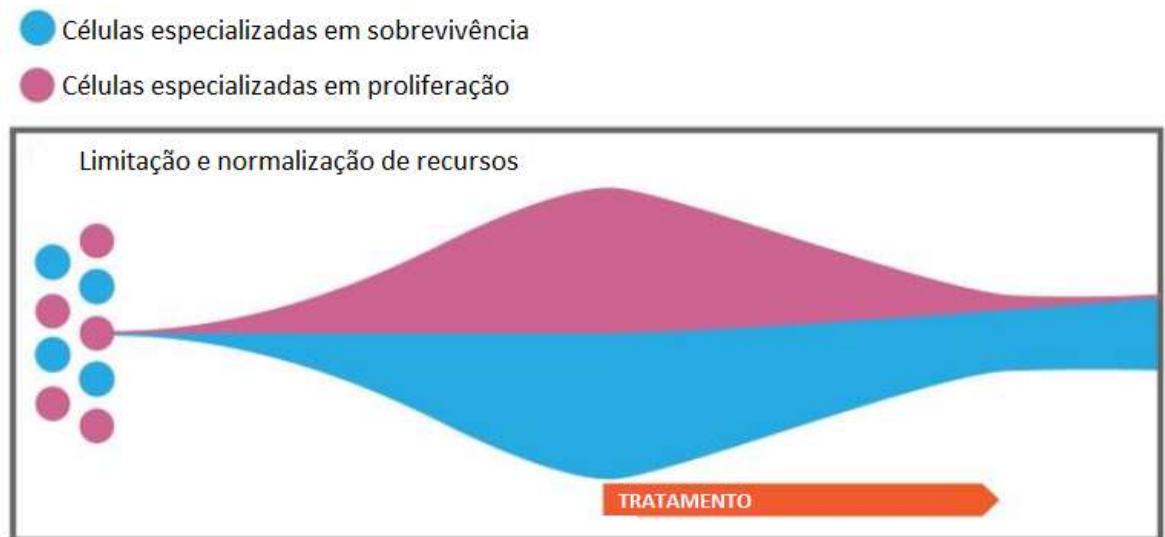


Figura 4: Efeito da quimioterapia nas diferentes estratégias de crescimento celular. A imagem representa a seleção de células tumorais após o tratamento com CDDP. Adaptado de Aktipis *et al* (2013).

Após o tratamento quimioterápico, as células com menor proliferação e mais especializadas na sobrevivência tendem a ser selecionadas. Estas células normalmente desenvolvem mecanismos de resistência à droga utilizada e remodelam o seu metabolismo

celular. Catanzaro *et al.* (2015) discute que os mecanismos de resistência podem levar a um maior consumo metabólico, logo, a uma maior dependência de uma fonte de energia como a glicose. Todavia, nas células de câncer, a utilização da glicose é preferida pela glicólise, muitas vezes não existindo o aumento de OXPHOS mesmo na presença de oxigênio. Contudo, foi observado que células de câncer quimioresistentes apresentam maior metabolismo ativo e, também, maior flexibilidade entre OXPHOS e glicólise (DAR *et al.*, 2017). Deste modo, células quimioresistentes mostram maior habilidade de sobrevivência por suportarem condições como ausência de glicose. Pelo fato do câncer e dos mecanismos de resistência à quimioterapia serem multifatoriais, situações contrárias também podem ser encontradas, como a preferência de células tumorais pela OXPHOS e resistência a privação de glicose (PASTÒ *et al.*, 2014). Deste modo, se faz necessário o estudo do metabolismo celular e energética de células sensível e resistente à quimioterapia na tentativa de elucidar estes mecanismos para o desenvolvimento de futuras terapias personalizadas.

Como já discutido em publicações anteriores (DEBERARDINIS *et al.*, 2007; WARD; THOMPSON, 2012), células de câncer podem se adaptar e modular as suas necessidades metabólicas ou bioenergéticas para o sustento do seu *trade-off* celular. Para suprir as suas necessidades, as células mudam o seu substrato de preferência, dentre eles estão o metabolismo de glicose, glutamina e lipídeos. Portanto, o fenótipo metabólico das células de câncer varia, e medir ou monitorar os parâmetros ligados às características do câncer (reprogramação metabólica, fenótipo metabólico e preferência do substrato) proporcionará maior compreensão das necessidades metabólicas das células tumorais, o que ajudará no planejamento de terapias metabólicas (KALYANARAMAN *et al.*, 2018).

Uma grande variedade de tumores mostram serem capazes de utilizar não apenas glicose, mas também glutamina para a obtenção de energia celular e biosíntese. Diversos tipos de câncer obtêm a maior parte da sua energia pela respiração celular e OXPHOS. Glutamina é o substrato preferido para a fosforilação oxidativa em células tumorais (ALAM *et al.*, 2016). Outras investigações mostraram que certas linhagens de câncer invasivo dão preferência para o ciclo do ácido cítrico pelo aumento da utilização de glutamina, indicando o papel de OXPHOS no crescimento celular (YANG *et al.*, 2014). Não apenas o maior consumo, mas também a dependência por glutamina, pode estar ligada a deficiência no *fitness* da célula e a necessidade do estabelecimento do balanço redox (DUAN *et al.*, 2018). Com isso, além do metabolismo de glicose, o consumo de glutamina pode ser uma variável entre células sensíveis e resistentes à quimioterapia.

Diversas evidências mostram que a mitocôndria é o principal produtor de ROS na célula e, conseqüentemente, uma fonte de estresse oxidativo em ambientes adversos. Contudo, sob condições fisiológicas normais, a produção de ROS pela mitocôndria é altamente regulada, em grande parte, pelo complexo I para a garantia da homeostase (GENOVA *et al.*, 2003; KUSHNAREVA; MURPHY; ANDREYEV, 2002). Portanto, uma maior atividade mitocondrial fornece maior quantidade de ATP para a célula, mas também leva a um aumento do estresse oxidativo, podendo não ser vantajoso para a células. Além disso, na presença de um agente químico, a homeostase celular pode ser perturbada resultando em maior produção de ROS. Com isso, maiores níveis de ROS podem ser encontrados em células de câncer tratadas com quimioterápicos. A eficiente detoxificação de ROS é um dos mecanismos envolvidos na estratégia celular de máxima sobrevivência (crescimento lento) e um conhecido mecanismo de resistência a CDDP (DUAN *et al.*, 2017). Dessa forma, a célula precisa encontrar um balanço entre a sua necessidade metabólica/bioenergética e sua homeostase redox para se adaptar ao tratamento quimioterápico.

1.3 Justificativa

O câncer de pulmão tem alta incidência mundial e é a principal causa de mortes por câncer no mundo, sendo a cisplatina o quimioterápico mais utilizado para o tratamento da doença. Contudo, a resistência à cisplatina se mantém como um obstáculo recorrente ao tratamento de pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado. Apesar dos mecanismos moleculares de resistência a essa droga serem bem conhecidos, nenhuma alternativa efetiva para o problema foi desenvolvida. Nosso laboratório tem utilizado modelos celulares para o estudo de proteínas e mecanismos moleculares envolvidos na resistência à cisplatina em câncer de pulmão. Entretanto, estudos relacionados ao metabolismo e bioenergética das linhagens desenvolvidas não foram realizados até então e se tornam necessários para a caracterização destas linhagens. O melhor entendimento das necessidades metabólicas e bioenergéticas dessas células pode auxiliar na identificação de proteínas e vias celulares envolvidas na resistência à cisplatina. Os resultados obtidos poderão levar à identificação de potenciais alvos para o desenvolvimento de terapias quimiosensibilizantes, bem como apontar proteínas candidatas para utilização como biomarcadores preditivos da resposta à quimioterapia em NSCLC. O conhecimento gerado poderá contribuir para o desenvolvimento de terapias anticâncer personalizadas mais eficientes e menos tóxicas.

2. OBJETIVO

Desenvolver uma sublinhagem resistente à CDDP a partir da linhagem parental de adenocarcinoma de pulmão A549 e avaliar comparativamente o seu perfil metabólico e bioenergético.

2.1 Objetivos específicos

- i. Desenvolver uma sublinhagem com resistência adquirida à CDDP a partir da linhagem parental A549
- ii. Avaliar o nível de resistência das células sensíveis e resistentes à CDDP
- iii. Avaliar a capacidade clonogênica das células sensíveis e resistentes a CDDP em presença e ausência da droga
- iv. Avaliar a dependência de glicose no crescimento das linhagens
- v. Avaliar a dependência de glutamina no crescimento das linhagens
- vi. Avaliar o impacto de moléculas antioxidantes no crescimento das linhagens estudadas
- vii. Comparar os níveis de respiração celular entre a linhagem sensível e resistente à CDDP

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular e desenvolvimento de resistência

Células humanas de NSCLC A549 foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino em presença de penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) a 37 °C em atmosfera umidificada e 5% de CO₂. A sublinhagem com resistência adquirida à cisplatina, denominada A549-RA, foi desenvolvida a partir da exposição de 5 x 10⁵ células da linhagem parental A549 a 0,1 µM de cisplatina (CDDP) por 72 h, e assim subsequentemente com concentrações crescentes da droga (0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 µM). As células foram mantidas em meio contendo 0,5 µM de CDDP até 3 dias antes de cada experimento para garantir a manutenção do fenótipo de resistência. Foram geradas duas sublinhagens resistentes a CDDP de forma independente utilizando o mesmo protocolo, sendo consideradas replicatas biológicas em cada experimento.

3.2 Análise da resistência à cisplatina

2,5 x 10⁴ células de cada linhagem foram semeadas em placas de 12 poços contendo 1 mL de meio e tratadas com 0, 1, 2 e 4 µM de CDDP por 72 h, sendo as células não tratadas com a droga consideradas o controle negativo do ensaio. Ao final do tratamento, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer na presença de azul de tripan. O experimento foi realizado em quadruplicata. Para o cálculo da porcentagem de crescimento foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de células pós 72 h} - \text{número de células semeadas}}{\text{controle negativo} - \text{número de células semeadas}} = \% \text{ de crescimento}$$

O valor de GI₅₀ (do inglês, *growth inhibition of 50 %*), concentração da droga que causa redução de 50 % na proliferação das células, foi calculado para cada linhagem através de curva (*log*)*dose-resposta* pelo software GraphPad Prism 6.

3.3 Ensaio clonogênico

O ensaio foi realizado em placa de 6 poços, sendo semeadas 500 células de cada linhagem por poço. Após 10-14 dias de incubação, as colônias foram lavadas com PBS (137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂PO₄, 1,8 KH₂PO₄; pH = 7,4), fixadas e coradas por 30 min com solução de 6% de glutaraldeído e 0,5% de cristal violeta. Os poços foram lavados com água e secos a temperatura ambiente. As colônias foram contadas

utilizando o software ImageJ com o plugin Colony Counter e a contagem foi conferida manualmente.

3.4 Ensaio de proliferação celular

O ensaio foi realizado utilizando placas de 12 poços, onde $2,5 \times 10^4$ células foram semeadas em cada poço na presença de 1 mL de meio DMEM contendo 10% de soro feral bovino. A incubação foi feita em meio DMEM na ausência e presença do substrato de interesse (glicose ou glutamina), a 37 °C e atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas para a realização da contagem em câmara de Neubauer na presença de azul de tripan a cada 24 h.

3.5 Medida de consumo de O₂ mitocondrial

As medidas de consumo de O₂ mitocondrial das células A549 e A549-RA foram realizadas no respirômetro de alta resolução, Oroboros Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). As células (1×10^6) foram monitoradas em duas câmaras de vidro, sob agitação contínua a 37 °C, em 2 mL de meio RPMI-1640 sem soro fetal bovino. Nos primeiros minutos é observada a respiração basal da linhagem, após esta respiração ser estabilizada é adicionada oligomicina (2 µg/mL) para inibir a ATP sintase e obter o consumo mínimo de oxigênio (proton-LEAK), determinado pelo vazamento de prótons pela membrana interna mitocondrial. Para indução da respiração mitocondrial, foi adicionado o composto para concentração inicial de 0,5 µM e então foi titulado até que a respiração máxima chegasse ao seu platô. Em seguida, foi realizada a adição de rotenona 0,5 µM e antimicina A 2,5 µM, inibidores dos complexos I e III respectivamente, para bloquear a respiração celular e determinar o consumo de oxigênio residual ou não-mitocondrial (ROX, *residual oxygen consumption*) (MAKRECKA-KUKA; KRUMSCHNABEL; GNAIGER, 2015). A diferença da respiração basal e proton-LEAK permite inferir a quantidade de oxigênio consumido pela fosforilação oxidativa e, portanto, ligada a síntese de ATP. Pela diferença da respiração máxima atingida pelas células e a respiração basal é possível inferir a capacidade reserva teórica (Fig. 5).

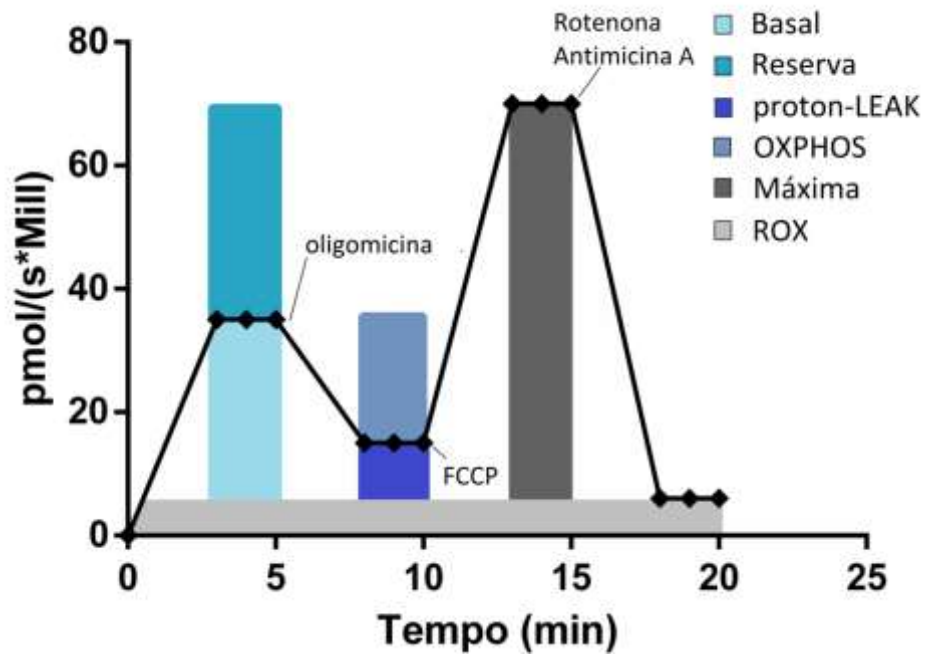


Figura 5: Gráfico representativo das medidas dos parâmetros de respiração celular realizados. O gráfico exemplifica as medidas de bioenergética mitocondrial obtidos com o respirômetro Oroboros Oxygraph-2K e as suas interpretações.

4. RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento de sublinhagens celulares resistentes a CDDP

A partir das células parentais A549, foram desenvolvidas duas sublinhagens resistentes à cisplatina utilizando o mesmo protocolo experimental, as quais foram denominadas A549-RA4 e A549-RA5. Estas sublinhagens foram consideradas duplicatas biológicas para todos os experimentos realizados, sendo apresentadas apenas como sublinhagem A549-RA em todos os experimentos. As células A549-RA4 e A549-RA5 mostraram níveis de resistência semelhantes (Fig. 6) com valores de GI_{50} de 8 e 7 vezes maiores que o da linhagem parental A549 ($p < 0,01$), respectivamente. Esses dados indicam que as sublinhagens desenvolvidas se mostraram mais resistentes à CDDP quando comparadas com a linhagem A549, que foi considerada sensível, assim confirmando a efetividade do protocolo utilizado para o desenvolvimento de resistência.

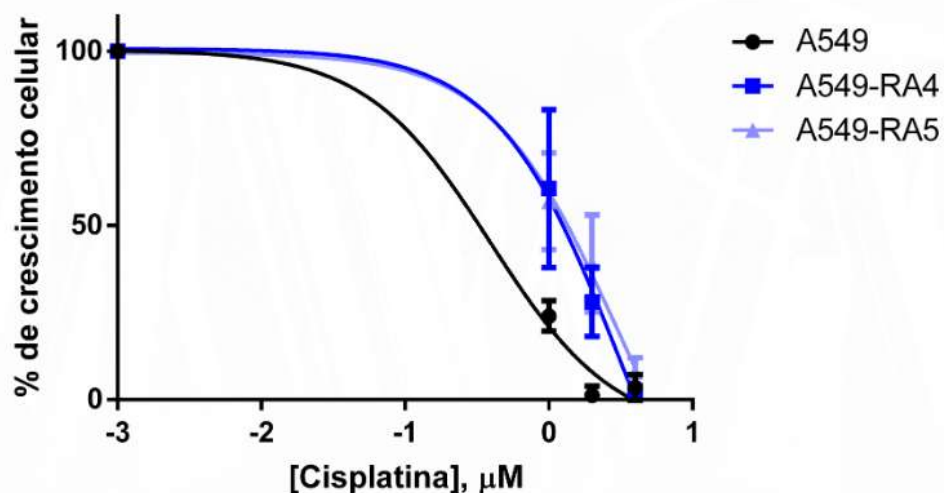


Figura 6: Crescimento celular na presença de cisplatina. Comparação das curvas de crescimento das células A549 ($GI_{50} = 0,392 \mu\text{M}$), A549-RA4 ($GI_{50} = 3,23 \mu\text{M}$) e A549-RA5 ($GI_{50} = 2,90 \mu\text{M}$) em 1, 2 e 4 μM de CDDP.

4.2 As células resistentes à cisplatina apresentam estratégia celular de máxima sobrevivência (crescimento lento)

A capacidade de formação de colônias das células A549 e A549-RA foi avaliada em ensaio clonogênico. A linhagem A549 mostrou maior capacidade clonogênica quando comparada com a sublinhagem A549-RA na ausência de CDDP (Fig. 7). Porém, na presença de CDDP as células sensíveis perdem esta vantagem, enquanto as células resistentes não são afetadas (Fig. 8). Portanto, o *fitness* apresentado pelas células A549-RA se mostra vantajoso na presença da droga por privilegiar a sobrevivência, enquanto as células A549 obtêm

vantagem na ausência da droga pelo seu *trade-off* proliferativo. Além disso, estes dados confirmam o fenótipo de resistência à cisplatina das células A549-RA.

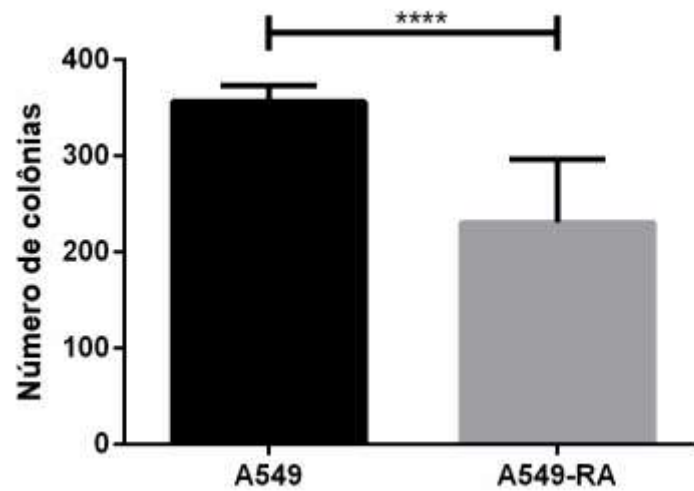


Figura 7: Capacidade clonogênica das células A549 e A549-RA. Os valores são mostrados como média \pm erro padrão, **** indica um $p \leq 0,0001$, utilizando teste t.

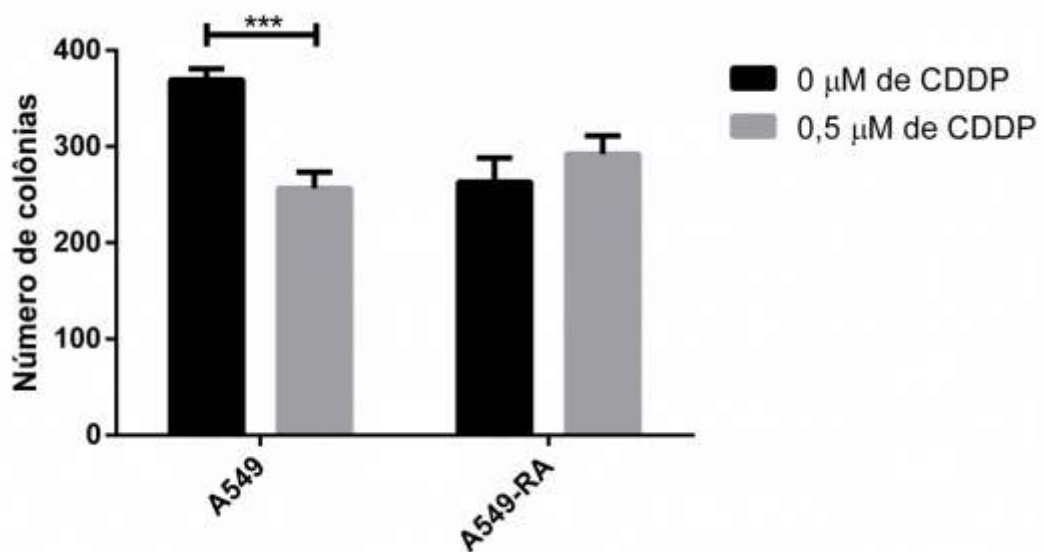


Figura 8: Capacidade clonogênica das células A549 e A549-RA na presença e na ausência de CDDP. Comparação entre a capacidade clonogênica das células na presença (0,5 μ M) e na ausência de CDDP. A549 mostrou diminuição no número de colônias na presença da droga. Os valores são mostrados como média \pm erro padrão, *** indica um $p \leq 0,001$, utilizando ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Sidak.

4.3 Moléculas antioxidantes não impactam o crescimento das células A549 e A549-RA

Para avaliar uma possível interferência de ROS no crescimento celular das células resistentes à CDDP foi realizado um ensaio clonogênico na presença de GSH. Não foi

observada diferença estatística no número de colônias formadas pelas células sensíveis ou resistentes a CDDP quando tratadas com o antioxidante (Fig. 9).

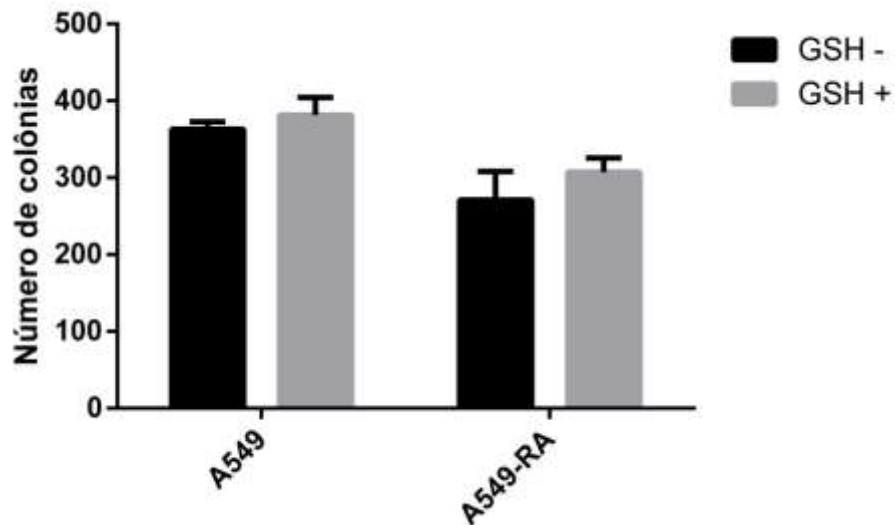


Figura 9: Ensaio clonogênico na ausência e presença de GSH. Crescimento das células A549 e A549-RA sob as condições indicadas. GSH (4 mM) foi adicionado ao meio de cultura no dia seguinte ao início do cultivo. Os valores são mostrados como média \pm erro padrão e a estatística utilizada foi ANOVA de duas vias.

Para dar maior suporte aos dados encontrados, foi realizado um ensaio clonogênico com um *cocktail* antioxidante. O meio foi suplementado com L-ascorbato, GSH e N-acetil-L-cisteína e a capacidade clonogênica das células foi comparada na presença e na ausência dos oxidantes. Novamente, as células sensíveis e resistentes à CDDP não mostraram diferença na sua capacidade clonogênica quando tratadas com as moléculas antioxidantes (Fig. 10). Estes dados indicam que no fenótipo de crescimento, tanto das células sensíveis quanto das células resistências, não existe um impacto aparente de ROS.

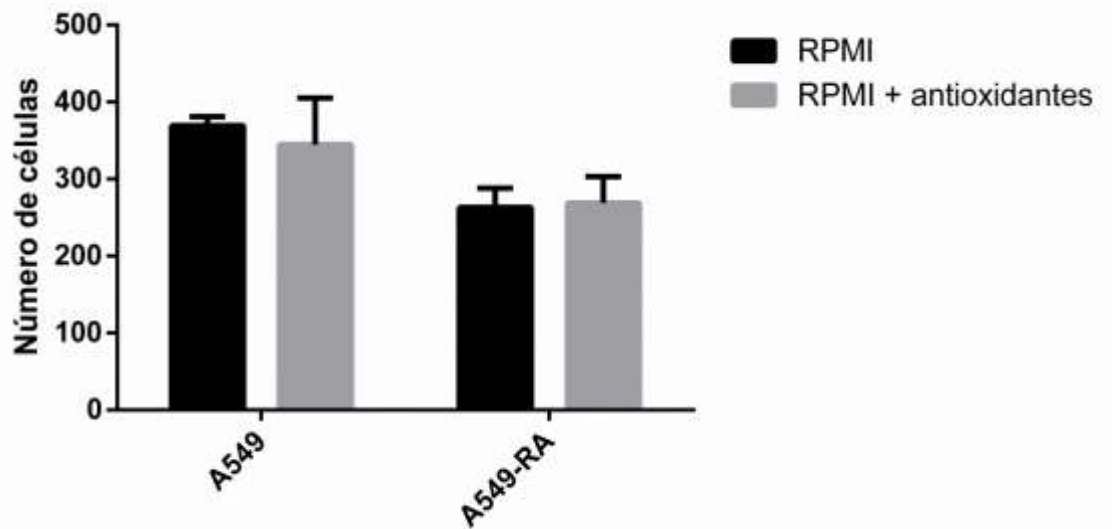


Figura 10: Avaliação do efeito de moléculas antioxidantes na capacidade clonogênica das células A549 e A549-RA. L-ascorbato (20 μ M), GSH (4 μ M) e N-acetil-L-cisteína (4 mM) foram adicionado ao meio de cultura no dia seguinte ao início do cultivo para compor o meio antioxidante. Os valores são mostrados como média \pm erro padrão e a estatística utilizada foi ANOVA de duas vias.

4.4 As células A549-RA são mais sensíveis à privação de glicose

Um ensaio de proliferação na ausência e presença de glicose foi realizado para investigar a dependência de glicose das células estudadas. Após 48 h de cultivo, a ausência de glicose impactou negativamente o crescimento das células A549 e A549-RA ($p \leq 0,05$) (Fig. 11). Após 96 h de cultivo, as células A549-RA ($p \leq 0,0001$) se mostraram mais sensíveis à privação de glicose do que as células A549 ($p \leq 0,01$). Na comparação entre a porcentagem de células crescendo na ausência de glicose em relação ao controle após 96 h de cultivo, as células A549-RA se mostraram mais dependentes de glicose para a proliferação quando comparadas com as células A549 (Fig. 12).

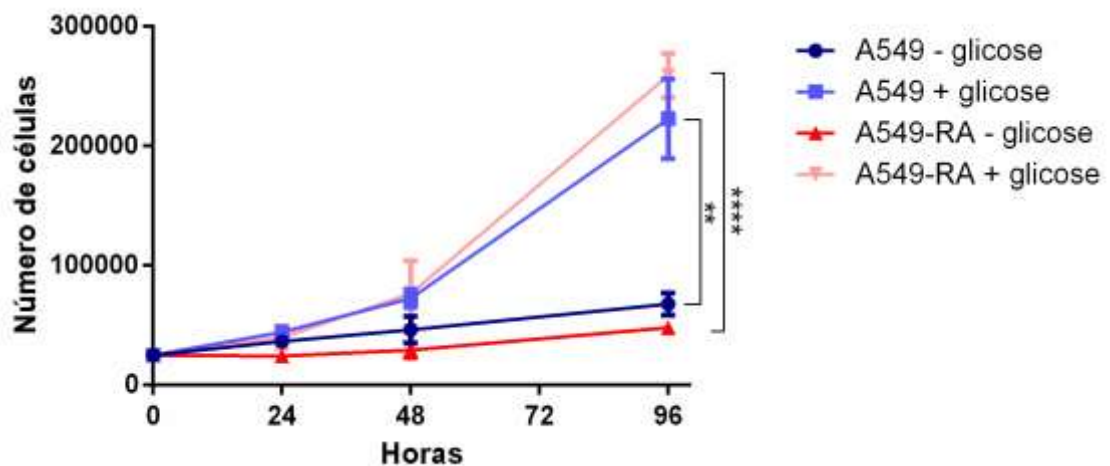


Figura 11: Proliferação das células A549 e A549-RA na presença e ausência de glicose. Células foram cultivadas em meio DMEM com (2 g/L) e sem glicose em sua composição, onde ambas as linhagens se mostraram dependentes de glicose para a sua proliferação. Os valores são mostrados como média \pm erro padrão, ** indica um $p \leq 0,01$, **** indica um $p \leq 0,0001$ utilizando testes t múltiplos comparando o tratamento dentro de cada linhagem em cada tempo.

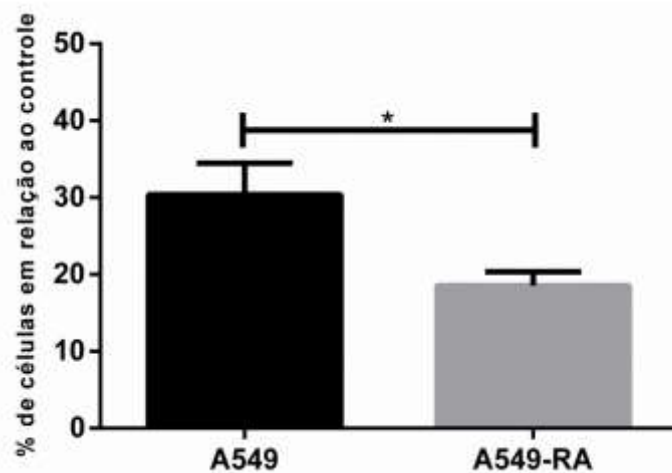


Figura 12: Porcentagem de crescimento celular em relação ao controle na ausência de glicose em 96 h. Porcentagem celular de crescimento em ausência de glicose comparada ao controle (considerando a média da contagem de crescimento na presença de glicose como crescimento máximo). Os valores são mostrados como média \pm erro padrão, * indica um $p \leq 0,01$, utilizando teste t.

4.5 O crescimento das células A549 e A549-RA é igualmente dependente de glutamina

O efeito da glutamina no crescimento das células A549 e A549-RA foi avaliado por ensaio clonogênico através de suplementação do meio RPMI com 2 mM glutamina. A capacidade clonogênica de ambas as linhagens não foi afetada pela suplementação de glutamina no meio (Fig. 13), demonstrando que a concentração presente no meio RPMI é

suficiente para o metabolismo das células. O meio utilizado contém 2 mM de glutamina em sua composição e por isso as concentrações finais avaliadas no ensaio foram 2 e 4 mM.

Para verificar o efeito da ausência de glutamina no meio de cultivo sobre as linhagens estudadas foi utilizado ensaio de proliferação celular. Nenhuma modificação foi observada na proliferação celular em 24 h (Fig. 14 A), enquanto em 48 h, as células A549 e A549-RA tiveram a sua proliferação igualmente reduzida pela ausência de glutamina (Fig. 14 B). Estes dados indicam que a glutamina intracelular presente em ambas linhagens foi suficiente para suportar a necessidade metabólica das células nas primeiras 24 h. Contudo, em 48 h houve um impacto negativo no crescimento quando a glutamina intracelular foi consumida e estava ausente no meio extracelular.

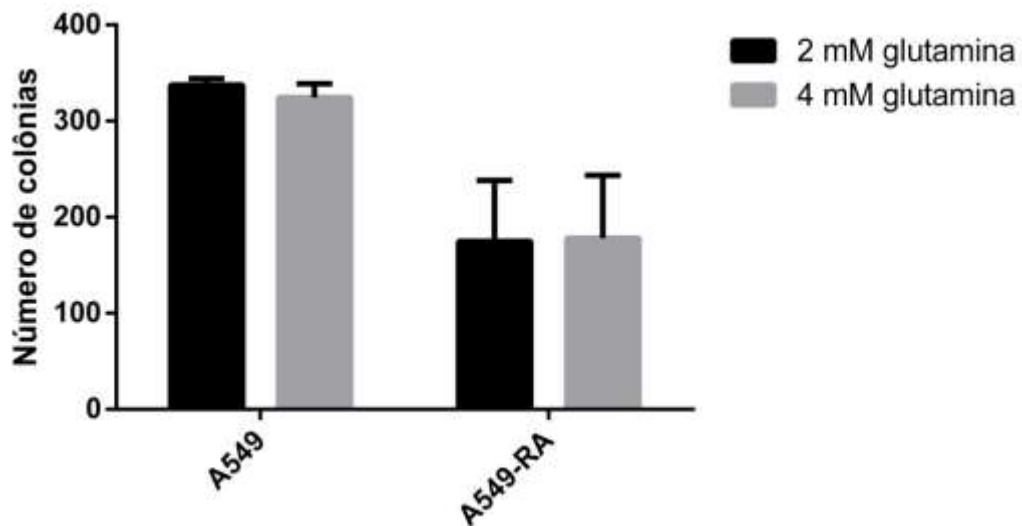


Figura 13: Ensaio clonogênico com diferentes concentrações de L-glutamina. Crescimento das células A549 e A549-RA sob as condições indicadas. L-glutamina (2 mM) foi adicionada ao meio de cultura no dia seguinte ao início do cultivo, onde já estava presente a glutamina intrínseca do meio RPMI (2 mM). Os valores são mostrados como média \pm erro padrão, utilizando ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Sidak.

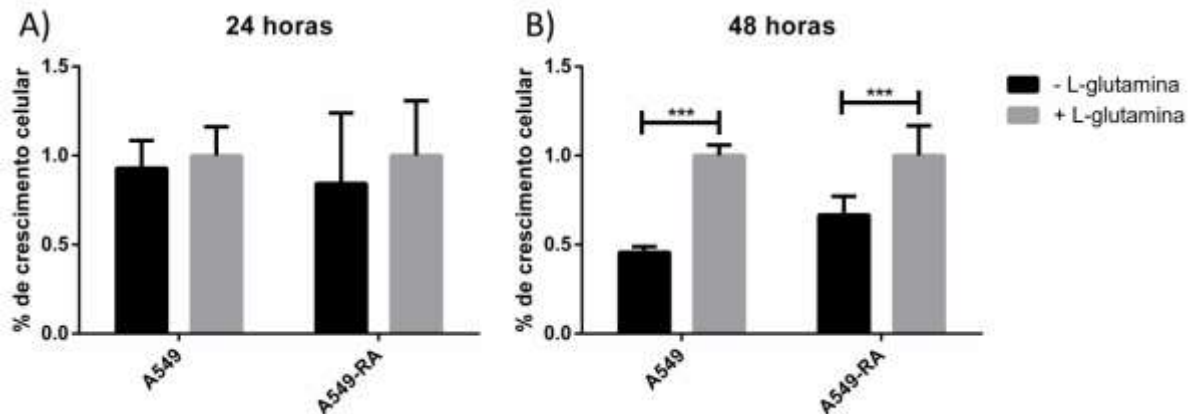


Figura 14: Ensaio de proliferação na presença e ausência de L-glutamina. Proliferação células A549 e A549-RA na presença e ausência de glutamina em 24 e 48 h. Dados normalizados pela média do crescimento no meio com glutamina. Os valores são mostrados como média \pm erro padrão, *** indica um $p \leq 0,001$ utilizando ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Sidak.

4.6 Perfil bioenergético mitocondrial semelhante entre as células A549 e A549-RA e maior quantidade de ROX nas células resistentes a CDDP

As medidas de respiração mitocondrial entre as células sensíveis e resistentes a CDDP não mostraram diferenças estatísticas na respiração basal, próton-LEAK, reserva e OXPHOS (Fig. 15 A-E). Estes valores indicam uma similaridade no perfil de respiração mitocondrial entre as células A549 e A549-RA. Contudo, foi observada uma maior quantidade de ROX na sublinhagem resistente (Fig. 15 F).

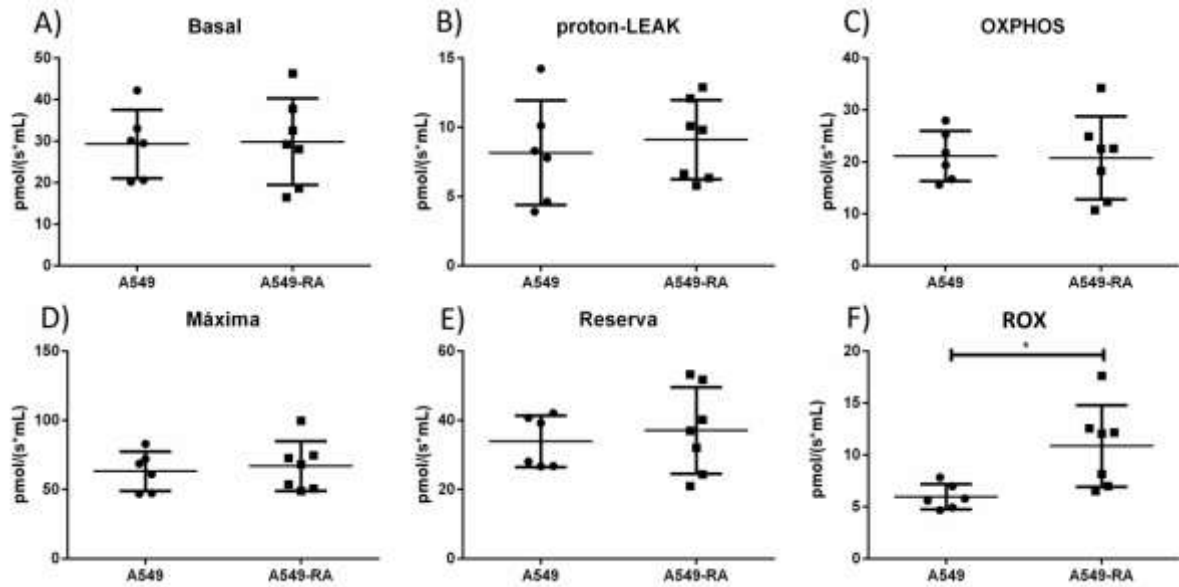


Figura 15: Medidas de consumo de O₂ mitocondrial pelas células A549 e A549-RA. A) respiração basal, B) respiração proton-LEAK, C) consumo de oxigênio pela OXPHOS, D) respiração máxima, E) capacidade reserva teórica e F) consumo de O₂ residual (ROX). A estatística realizada foi teste t de Student, par a par entre as linhagens, apresentando significância de $p < 0,05$ (*).

5. DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é o principal responsável por mortes relacionadas ao câncer no mundo. Apesar do tratamento ser realizado com CDDP, o tumor adquire resistência ao quimioterápico durante o tratamento. Com isso, estudos para o melhor entendimento de mecanismos de resistências são de extrema importância na tentativa de resolver este problema. Portanto, linhagens resistentes à CDDP com níveis de resistência clinicamente relevantes são poderosas ferramentas para os estudos destes eventos a níveis moleculares e celulares.

O desenvolvimento de células resistentes a CDDP para o estudo dos mecanismos de resistência foi uma ferramenta essencial para este trabalho. Após o tratamento com concentrações crescente da droga, as células obtiveram níveis de resistência significativamente maiores que a linhagem parental. Estudos têm mostrado que aumentos de resistência da ordem de 2 a 6 vezes em relação às células parentais são característicos de modelos celulares considerados clinicamente relevantes (MCDERMOTT *et al.*, 2014). Acredita-se que esses modelos, ao contrário dos modelos celulares com altos níveis de resistência, simulem melhor os mecanismos que ocorrem durante o tratamento clínico do câncer. Contudo, entre as desvantagens observadas nos modelos clinicamente relevantes podemos citar a resistência instável. Dessa forma, para evitar a perda de resistência durante o desenvolvimento do trabalho, as células foram mantidas na presença da droga. Além disso, baixos níveis de resistência estão, provavelmente, correlacionados com mudanças moleculares sutis, as quais podem ser difíceis de detectar, exigindo técnicas analíticas altamente sensíveis para o estudo desse modelo celular. Porém, os resultados obtidos a partir de modelos clinicamente relevantes podem ser altamente aplicáveis, ao contrário do pequeno avanço terapêutico observado quando explorados alvos selecionados a partir de modelos altamente resistentes, como o uso de inibidores de bombas de efluxo no tratamento de tumores resistentes (RAGUZ; YAGÜE, 2008).

Os dados de crescimento celular demonstraram que as células A549-RA apresentam um *fitness* vantajoso na presença de CDDP por privilegiar a sobrevivência (crescimento lento), enquanto as células A549 obtêm vantagem na ausência da droga pelo seu *trade-off* proliferativo. Estes dados demonstram uma possível vantagem adaptativa das células resistentes ao ambiente estressante gerado pelo quimioterápico uma vez que o *trade-off* de crescimento lento permite um maior controle da replicação celular e da homeostase da célula (SALGIA; KULKARNI, 2018).

Estudos recentes mostraram a maior presença de ROS em linhagens celulares resistentes à cisplatina (WANGPAICHITR *et al.*, 2017) e o seu impacto no crescimento celular (DUAN *et al.*, 2017). ROS tem a capacidade de causar dano no DNA, o que levaria também a uma diminuição na proliferação. Como GSH é um dos principais antioxidantes celulares, essa molécula pode diminuir a quantidade de ROS presente na célula e aumentar a sua capacidade de proliferação (DUAN *et al.*, 2017). Sendo assim, avaliamos o impacto de GSH no crescimento celular do nosso modelo de resistência à CDDP. Uma vez que a suplementação do meio de cultura com GSH não impactou no crescimento de nenhuma das linhagens (A549 e A549-RA), indicando que as células não necessitam de maior conteúdo de glutatona reduzida, os dados sugerem que ROS não possuem efeitos no crescimento celular das linhagens estudadas. Para comprovar os resultados obtidos com GSH, o crescimento celular foi também avaliado na presença de outras moléculas antioxidantes e novamente nenhuma diferença no crescimento celular foi observada. O L-ascorbato, também conhecido como vitamina C, é um dos mais abundantes anti-oxidantes presentes no corpo humano, quando dissolvido em água torna-se um doador de elétrons sendo utilizado como cofator para reações enzimáticas e podendo reagir com radicais livres potencialmente danosos para a célula doando seus elétrons (CHEN; HU; WANG, 2012). N-acetil-L-cisteína, além de ser um precursor para a síntese de GSH, apresenta propriedades antioxidantes, assim sendo amplamente utilizado desde proteção antioxidante até detoxificação de drogas (RUSHWORTH; MEGSON, 2014).

A glutamina é um composto essencial para a proliferação celular. Quando hidrolisada a glutamato, é um substrato para o ciclo do ácido cítrico e, também, um substrato para a síntese de GSH, participando, assim, diretamente do controle de ROS presente na célula (MULLEN *et al.*, 2012; WISE *et al.*, 2008). Estudos demonstraram que o consumo de glutamina pode estar aumentado em células resistentes à CDDP quando comparadas com a linhagem parental sensível (HUDSON *et al.*, 2016). O aumento do consumo de glutamina com o catabolismo da mesma já foi associado, existindo um maior catabolismo em linhagens resistentes a CDDP (DUAN *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstraram que o metabolismo de glutamina é semelhante entre as células A549 e A549-RA. Essa semelhança pode estar relacionada ao fato da glutamina ser o substrato preferido para a fosforilação oxidativa em células tumorais (ALAM *et al.*, 2016) e as células A549 e A549-RA não apresentaram diferenças no consumo de oxigênio pela OXPHOS. Além disso, a glutamina é também um substrato para a síntese de GSH e as células A549 e A549-RA parecem possuir níveis semelhantes de GSH intracelular, uma vez que seu crescimento não foi impactado pela

presença de GSH no meio. A sublinhagem resistente não apresentar maior necessidade de glutamina também pode estar associada a menor dependência do ciclo de ácido cítrico para obtenção de energia. O catabolismo de glutamina poderá ser melhor verificado em futuro ensaio clonogênico sem reposição do meio de cultivo, levando ao consumo e exaustão da glutamina do meio, como descrito por DUAN *et al* (2018).

As células A549-RA apresentam maior dependência por glicose, mas não mostrou diferença na OXPHOS, podendo ter como principal fonte de obtenção de energia a glicólise, e não a respiração mitocondrial. A linhagem A549 apresentou o perfil inverso da sublinhagem resistente, sendo menos dependente de glicose, podendo ser um indício de fácil utilização de outras fontes de energia. . Células humanas de câncer de ovário resistente à CDDP mostraram maior expressão de genes relacionados à glicólise quando comparadas às células sensíveis a droga (XU *et al.*, 2018), além de apresentarem maior sensibilidade à privação de glicose (CATANZARO *et al.*, 2015).

Os dados de respirometria mostraram uma semelhança no perfil bioenergético mitocondrial entre as células A549 e A549-RA. Foi observada uma diferença significativa apenas no consumo de oxigênio residual (ROX). O consumo de oxigênio não mitocondrial é amplamente variado entre os diferentes tipos celulares. A taxa de ROX pode ser influenciada principalmente pela quantidade de ROS da célula ou por enzimas que consomem oxigênio, como NADPH-oxidase, monoaminoxidase, enzimas da família citocromo P450, heme oxidase e xantina oxidase (WAGNER; VENKATARAMAN; BUETTNER, 2011). As evidências indicam que, possivelmente, a maior quantidade de ROX seja consequência da segunda situação. Além disso, o aumento do consumo de oxigênio não-mitocondrial pode sugerir uma possível mudança metabólica para a glicólise. Herst *et al* (2007) mostrou que células tumorais altamente glicolíticas usam o transporte de elétrons transmembrana (tPMET) para aliviar o estresse redutor intracelular, e de acordo com sua hipótese, o consumo de oxigênio pela superfície celular pode apoiar o metabolismo da energia glicolítica pela re-oxidação do NADH citosólico para facilitar a glicólise continuada.

Em nosso modelo celular de resistência à CDDP em câncer de pulmão, Martello *et al.* (dados não publicados) demonstram o aumento da expressão de proteínas envolvidas com o consumo de oxigênio não mitocondrial como heme oxigenase 1 (HMOX1) na sublinhagem A549-RA. Proteínas envolvidas na glicólise como fosfoglicerato mutase 1 (PGAM1) e lactato desidrogenase cadeia A (LDHA) também foram encontradas positivamente reguladas nas células resistentes. Silveira *et al.* (2018) detectaram a presença do transportador de glicose GLUT-1 exclusivamente em vesículas extracelulares secretadas por células A549-RA. Os

autores também, demonstraram maior presença da enzima LDHA nas vesículas secretadas pela sublinhagem A549-RA quando comparada com as vesículas liberadas pela linhagem A549. A proteína LDHA possui função de converter piruvato em lactato, cujas consequências são o aumento da concentração de lactato celular e, posterior, eliminação desse metabólito da célula. Nas mesmas vesículas foi identificada a proteína CD147, que atua como uma proteína auxiliar e indispensável para o transporte de lactato (SCHNEIDERHAN et al., 2009).

HMOX1 é uma enzima antioxidante de proteção celular e sua presença é correlacionada a utilização de tPMET pela célula. Quando o transporte de elétron pela membrana plasmática é diminuído pela utilização de inibidores ou a utilização de siRNA para componentes do tPMET (NQO1 e eNOX1) é induzida uma diminuição significativa de HMOX1. A enzima LDHA catalisa a conversão de piruvato para lactato no último passo da glicólise, uma marca do efeito de Warburg (MIAO et al., 2013). PGAM1 é uma enzima responsável por catalisar a interconversão de 3-fosfoglicerato e 2-fosfoglicerato durante a glicólise. Estas enzimas são comumente encontradas positivamente reguladas em diversos tipos de câncer por estarem diretamente ligadas à glicólise e por isso são descritas com um alto potencial terapêutico (JIANG et al., 2014; MIAO et al., 2013). GLUT-1 é um importante transportador que medeia o influxo de glicose para a célula e já se mostrou possivelmente envolvido com a resistência à CDDP, quando este gene é silenciado em células de câncer de cabeça e pescoço é observada uma sensibilização ao tratamento com CDDP (WANG; LI; LIAO, 2013).

Sabendo que a respiração mitocondrial é uma das principais produtoras de ROS, a similaridade dos parâmetros de respiração entre as células A549 e A549-RA, principalmente a taxa de OXPHOS, suportam os a hipótese que as células resistentes desenvolvidas neste trabalho não possuem maior quantidade de ROS quando comparadas com a linhagem parental A549. A semelhança da respiração mitocondrial também pode justificar a semelhança na dependência de glutamina entre as linhagens, visto que este aminoácido é uma fonte de energia preferencial do ciclo do ácido cítrico (WANGPAICHITR *et al.*, 2017). Sendo assim, os experimentos realizados neste estudo mostraram uma similaridade, não apenas na respiração, mas também no metabolismo de um dos compostos que é utilizado como fonte de carbono pela célula, a glutamina.

6. CONCLUSÃO

O protocolo de desenvolvimento de resistência celular adquirida através da exposição a concentrações crescentes de CDDP foi efetivo para o estabelecimento de uma sublinhagem de adenocarcinoma de pulmão resistente a droga. As células da sublinhagem A549-RA apresentaram mudanças de fenótipo quanto a proliferação, capacidade clonogênica e metabolismo celular caracterizando a resistência da sublinhagem desenvolvida. Os dados indicam que as células resistentes adaptaram seu metabolismo ao ambiente citotóxico adotando um *trade-off* de crescimento lento não associado ao estresse oxidativo. A maior dependência de glicose e a similaridade nos parâmetros de respiração mitocondrial permitem propor um aumento na glicólise para obtenção de energia nas células A549-RA.

7. PERSPECTIVAS

Para as próximas etapas deste trabalho:

- i. Análise do catabolismo de glutamina entre as linhagens estudadas
- ii. Avaliar a expressão de genes associados a glicólise nas células A549 e A549-RA
- iii. Estabelecimento de proteínas alvo para a validação de mecanismos de resistência à CDDP correlacionando dos dados de proteômica encontrados pelo nosso grupo e os dados encontrados neste trabalho
- iv. Silenciamento de genes por RNAi e verificação do impacto na resistência e no metabolismo das linhagens A549 e A549-RA.

8. REFERÊNCIAS

- AKTIPIIS, C. A. et al. Life history trade-offs in cancer evolution. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 12, p. 883–92, 2013.
- ALAM, M. et al. A holistic view of cancer bioenergetics: mitochondrial function and respiration play fundamental roles in the development and progression of diverse tumors. **Clinical and Translational Medicine**, v. 5, p. 3, 2016.
- BASU, A.; KRISHNAMURTHY, S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, n. 1, p. 117–23, jan. 2010.
- BOZIC, I. et al. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. **eLife**, v. 2, p. e00747, 25 jun. 2013.
- CATANZARO, D. et al. Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase sensitizes cisplatin-resistant cells to death. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p. 30102–30114, 6 out. 2015.
- CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013–1024, nov. 2012.
- CUI, Y. et al. Increased MALAT1 expression contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. **Oncology Letters**, v. 16, n. 4, p. 4821–4828, 10 ago. 2018.
- DAR, S. et al. Bioenergetic Adaptations in Chemoresistant Ovarian Cancer Cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8760, 18 dez. 2017.
- DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European journal of pharmacology**, v. 740, p. 364–78, 5 out. 2014.
- DEBERARDINIS, R. J. et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19345–19350, 4 dez. 2007.
- DI GREGORIO, A.; BOWLING, S.; RODRIGUEZ, T. A. Cell Competition and Its Role in the Regulation of Cell Fitness from Development to Cancer. **Developmental Cell**, v. 38, n. 6, p. 621–634, 26 set. 2016.
- DUAN, G. et al. A Strategy to Delay the Development of Cisplatin Resistance by Maintaining a Certain Amount of Cisplatin-Sensitive Cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 432, 27 dez. 2017a.
- DUAN, G. et al. A Strategy to Delay the Development of Cisplatin Resistance by Maintaining a Certain Amount of Cisplatin-Sensitive Cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 432, 27 dez. 2017b.

DUAN, G. et al. Increased Glutamine Consumption in Cisplatin-Resistant Cells Has a Negative Impact on Cell Growth. **Scientific Reports**, n. February, p. 1–11, 2018a.

DUAN, G. et al. Increased Glutamine Consumption in Cisplatin-Resistant Cells Has a Negative Impact on Cell Growth. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4067, 6 dez. 2018b.

GENOVA, M. L. et al. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 228, n. 5, p. 506–13, maio 2003.

GILLET, J.-P. et al. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 46, p. 18708–13, 15 nov. 2011.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306–313, 19 jan. 2012.

HAGHGOO, S. M. et al. Pharmacogenomics and targeted therapy of cancer: Focusing on non-small cell lung cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 754, p. 82–91, 5 maio 2015.

HERST, P. M.; BERRIDGE, M. V. Cell surface oxygen consumption: A major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, n. 2, p. 170–177, fev. 2007.

HUDSON, C. D. et al. Altered glutamine metabolism in platinum resistant ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 41637–41649, 5 jul. 2016.

INCA. **Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 7 nov. 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer Today**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 29 set. 2018.

JIANG, X. et al. The role of phosphoglycerate mutase 1 in tumor aerobic glycolysis and its potential therapeutic implications. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 9, p. 1991–1996, 1 nov. 2014.

KALYANARAMAN, B. et al. A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds. **Redox Biology**, v. 14, p. 316–327, abr. 2018.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573–584, 12 ago. 2007.

KÖBERLE, B. et al. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1806, n. 2, p. 172–182, dez. 2010.

KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 5, p. 325–337, 14 maio 2011.

KUSHNAREVA, Y.; MURPHY, A. N.; ANDREYEV, A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. **The Biochemical journal**, v. 368, n. Pt 2, p. 545–53, 1 dez. 2002.

MAKRECKA-KUKA, M.; KRUMSCHNABEL, G.; GNAIGER, E. High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1319–38, 29 jun. 2015.

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.

MIAO, P. et al. Lactate dehydrogenase a in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. **IUBMB Life**, v. 65, n. 11, p. 904–910, nov. 2013.

MULLEN, A. R. et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 385–388, 20 jan. 2012.

OUYANG, X. et al. Osteopontin promotes cancer cell drug resistance, invasion, and lactate production and is associated with poor outcome of patients with advanced non-small-cell lung cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 11, p. 5933–5941, set. 2018.

PASTÒ, A. et al. Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. **Oncotarget**, v. 5, n. 12, p. 4305–19, 30 jun. 2014.

RAGUZ, S.; YAGÜE, E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 3, p. 387–391, 29 ago. 2008.

RAHIB, L. et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. **Cancer research**, v. 74, n. 11, p. 2913–21, 1 jun. 2014.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM

ELECTRODE. **Nature**, v. 205, p. 698–9, 13 fev. 1965.

RUSHWORTH, G. F.; MEGSON, I. L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 150–159, 1 fev. 2014.

SALGIA, R.; KULKARNI, P. The Genetic/Non-genetic Duality of Drug ‘Resistance’ in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 4, n. 2, p. 110–118, fev. 2018.

SCHNEIDERHAN, W. et al. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. **Gut**, v. 58, n. 10, p. 1391–1398, 1 out. 2009.

SHEN, D.-W. et al. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 3, p. 706–21, jul. 2012.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265–79, 20 out. 2003.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SOCINSKI, M. A. Cytotoxic Chemotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of Standard Treatment Paradigms. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 12, p. 4210S–4214S, 15 jun. 2004.

STEARNS, S. C. (STEPHEN C. . **The evolution of life histories**. [s.l.] Oxford University Press, 1992.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 1 mar. 2015.

WAGNER, B. A.; VENKATARAMAN, S.; BUETTNER, G. R. The rate of oxygen utilization by cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 3, p. 700–712, 1 ago. 2011.

WANG, Y.-D.; LI, S.-J.; LIAO, J.-X. Inhibition of Glucose Transporter 1 (GLUT1) Chemosensitized Head and Neck Cancer Cells to Cisplatin. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 12, n. 6, p. 525–535, dez. 2013.

WANGPAICHITR, M. et al. Exploiting ROS and metabolic differences to kill cisplatin resistant lung cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 49275–49292, 25 jul. 2017.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 297–308, 20 mar. 2012.

WISE, D. R. et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates

mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 48, p. 18782–18787, 2 dez. 2008.

XU, Y. et al. ABT737 reverses cisplatin resistance by targeting glucose metabolism of human ovarian cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 53, n. 3, p. 1055–1068, 9 jul. 2018.

YANG, L. et al. Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. **Molecular systems biology**, v. 10, n. 5, p. 728, 5 maio 2014.

ZHANG, H. et al. In Vitro Radiobiological Advantages of Hypofractionation Compared with Conventional Fractionation: Early-Passage NSCLC Cells are Less Aggressive after Hypofractionation. **Radiation Research**, p. RR14951.1, 20 set. 2018.