

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação do papel de BDNF / TrkB em processos de resistência em células de  
câncer colorretal humano

Rafael Pereira dos Santos

Porto Alegre, novembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação do papel de BDNF / TrkB em processos de resistência em células de  
câncer colorretal humano

Rafael Pereira dos Santos

Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof. Dr. Rafael Roesler

Orientador

Dra. Caroline Brunetto de Farias

Co-Orientadora

Porto Alegre, novembro de 2013

Sonhe e ouse sonhar,  
você nunca irá além dos seus sonhos!

Marco Feliciano

## **AGRADECIMENTOS**

Ao pensar em agradecimento, o primeiro que vem à minha mente e ao meu coração certamente é Deus, na pessoa do seu filho Jesus Cristo, e sempre presente pelo Espírito Santo. Senhor, muito obrigado por tudo, e como a tua Palavra afirma, hoje posso dizer: “até aqui o Senhor me ajudou”.

Acho lindo o fato de Deus ter várias formas de abençoar o ser humano, e a principal delas é usar outras pessoas para fazer isso. Então, agradeço também a Deus por todas as pessoas que Ele colocou em meu caminho para me ajudar a concluir este trabalho. Agradeço aos meus pais, a minha mãe que me deu toda base de fé, e assim me ajudou desde o vestibular, e ao meu pai, que sempre me apoiou, com uma força incansável e um amor incondicional. Pais, amo vocês, obrigado mesmo! Obrigado também à Jéssica e o Oseias, pelo apoio e amizade, amo muito vocês.

A outra pessoa que eu preciso mesmo agradecer é minha linda esposa, Gabriela, que foi muito mais que esposa, foi amiga, companheira, suportou todas as dificuldades ao meu lado, os anos de ausência em muitos momentos (e foram muitos mesmo), e que agora compartilha junto comigo essa alegria. Amor, obrigado mesmo, a cada dia te amo mais, reconhecendo que sem ti eu não teria chegado até aqui. Contrariando o que dizem, que atrás de um grande homem sempre tem uma grande mulher, prefiro dizer que é ao lado de um grande homem que está uma grande mulher! E claro, obrigado também por ter nos dado a Rafa, nossa princesa que alegre e transforma para melhor cada dia de nossas vidas.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Pesquisas em Câncer, do HCPA. Neste local eu aprendi tudo o que sei sobre ciência, pesquisa, foi onde recebi toda a base de meu pensamento científico, e onde pude realizar este trabalho. Agradeço a cada colega, os que estão e os que já se foram. Um obrigado especial a Lilian que foi uma super colega me ajudando nos experimentos e cuidando das células. E eu não poderia deixar de destacar a pessoa no laboratório que me ensinou praticamente tudo o que sei, me ajudando incansavelmente, sempre compreensiva e com muita paciência, Carol, serei eternamente grato por tudo o que fizeste por mim nesses anos. Muito obrigado!

Agradeço aos amigos, colegas, que foram parceiros ao longo dos anos de faculdade, apoiando e incentivando. São muitos. Obrigado a todos vocês.

## RESUMO

O câncer de cólon e reto (CCR) destaca-se como um dos principais em incidência e mortalidade, e representa cerca de um milhão de casos. O uso de quimioterápicos e, mais recentemente, a terapia molecular alvo-dirigida tem sido comumente usados no combate a essa enfermidade. Cetuximabe é um anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mas, muitas vezes, os pacientes apresentam resistência ao tratamento. TrkA, TrkB e TrkC são receptores quinase relacionados à tropomiosina. Seus ligantes são as neurotrofinas, dentre as quais destaca-se o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). Evidências que a via de sinalização BDNF / TrkB pode estar envolvida no crescimento celular, metástase e resistência à terapia tem sido recentemente relacionadas a diversos outros tipos de câncer, incluindo tumores de tecidos não-neuronais. Resultados do nosso grupo de pesquisa forneceram a primeira evidência de que BDNF/ TrkB possa desempenhar um papel na progressão da linhagem celular HT-29 de câncer colorretal e esteja envolvido em mecanismos de resistência a drogas antitumorais. O objetivo do presente trabalho foi induzir resistência à cetuximabe em células de câncer colorretal para analisar e comparar células HT-29 normais (controle) com células resistentes. As células foram plaqueadas e, 24 horas após, foram tratadas com Cetuximabe (0,5mg/mL, 1,0mg/mL e 2,0mg/mL) e K252a (10nM, 100nM e 1000nM). Após 48 horas do plaqueamento das células, tratou-se com BDNF humano recombinante (10ng/mL), EGF (2mg/mL), associados ou não a K252a. Para análise foram utilizadas as técnicas de MTT, contagem celular com exclusão por Azul de Tripam, RT-PCR e ensaio cometa alcalino. A análise estatística foi realizada por análise de variância de uma via One-Way (ANOVA) seguida do teste *post hoc* Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As células HT-29 resistentes à cetuximabe responderam igualmente ao tratamento com K252a comparadas às células normais, sugerindo que este fármaco possa ser utilizado no futuro para o tratamento de câncer colorretal. As duas linhagens demonstraram diferenças na expressão de mRNA de BDNF, TrkB e EGFR e não exibiram diferenças ao analisar dano ao DNA. Além disso, BDNF e EGF não foram capazes de reverter o efeito antiproliferativo de K252a.

Palavras-chave: câncer colorretal, BDNF, TrkB, EGFR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. EGFR (ErbB1) e suas vias de sinalização.....	09
Figura 2. Neurotrofinas e seus receptores.....	10
Figura 3. Viabilidade de células de tumor colorretal, HT-29, controle e resistentes tratadas com cetuximabe.....	18
Figura 4. Viabilidade de células de tumor colorretal, HT-29, controle e resistentes tratadas com K252a.....	19
Figura 5. Expressão de mRNA de células de tumor colorretal, HT-29, para <i>primers</i> BDNF, TrkB e EGFR.....	20
Figura 6. Viabilidade de células de tumor colorretal, HT-29, tratadas com K252a + BDNF ou EGF.....	21
Figura 7. Danos no DNA em células de tumor colorretal HT-29.....	22

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	08
Câncer de cólon e reto (CCR).....	08
Neurotrofinas e seus receptores.....	10
Resistência e via do EGFR / TrkB em câncer colorretal .....	11
OBJETIVOS.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
Cultivo celular e tratamentos.....	14
Indução de resistência à cetuximabe em células HT-29.....	14
Método do MTT.....	15
Contagem celular com exclusão com Azul de Tripam.....	15
Análise da expressão de mRNA por RT-PCR.....	15
Ensaio cometa alcalino.....	16
Análise estatística.....	17
RESULTADOS.....	18
Tratamento a longo prazo com cetuximabe resulta em células resistentes... 18	
Células HT-29 resistentes a cetuximabe respondem igualmente ao tratamento com K252a comparadas a células normais.....	18
Células resistentes demonstraram diferenças na expressão de mRNA de BDNF, TrkB e EGFR.....	19
BDNF e EGF não são capazes de reverter o efeito antiproliferativo de K252a.....	20

Células HT-29 normais e resistentes não exibem diferenças ao analisar dano ao DNA.....	21
DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	25
REFERÊNCIAS.....	26



## INTRODUÇÃO

### **Câncer de cólon e reto (CCR)**

O câncer de cólon e reto (CCR) destaca-se como um dos principais em incidência e mortalidade no Brasil e no mundo. Aproximadamente um milhão (9,4%) de todos os casos de câncer são de cólon e reto. No Brasil, as estimativas no ano de 2012 são válidas também para 2013 e apontam para 14.180 casos novos de câncer do cólon e reto em homens e 15.960 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres [1].

O câncer colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. É tratável e, na maioria dos casos, curável, ao ser detectado precocemente, quando ainda não se disseminou para outros órgãos. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos: lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Uma maneira de prevenir o aparecimento dos tumores seria a detecção e a remoção dos pólipos antes de eles se tornarem malignos. A cirurgia é o tratamento inicial, retirando a parte do intestino afetada e os nódulos linfáticos (pequenas estruturas que fazem parte do sistema imunológico) próximos à região. Em seguida, a radioterapia, associada ou não à quimioterapia, é utilizada para diminuir a possibilidade de recidiva do tumor. O tratamento depende principalmente do tamanho, localização e extensão do tumor. Quando a doença está disseminada, com metástases para o fígado, pulmão ou outros órgãos, as chances de cura ficam reduzidas [1, 2].

O uso de quimioterápicos e mais recentemente a terapia molecular alvo-dirigida, que tem avançado na compreensão dos mecanismos que levam a um tecido normal a sofrer malignização, entendendo suas características moleculares e expressões fenotípicas. Devem ser considerados os responsáveis pela melhora da sobrevida mediana, de menos de um ano para mais de 24 meses, no caso de doença metastática. O 5-fluoracil é o quimioterápico mais antigo e utilizado, muitas vezes em associação ao leucovorin, embora também sejam bastante utilizados irinotecano, oxaliplatina, capecitabina, bevacizumabe e cetuximabe [2, 3].

Cetuximabe é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1 que se liga especificamente ao domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *Epidermic Growth Factor Receptor*). O EGFR é uma glicoproteína transmembrana que pertence à subfamília do tipo I de Receptores Tirosina Quinase. Com ação anti-EGFR, o cetuximabe (assim como panitumumabe e outros) se liga ao domínio extracelular do EGFR (ErbB1) impedindo a dimerização do receptor. Esta ligação gera internalização do complexo receptor-anticorpo e impede a autofosforilação de EGFR-tirosina e, conseqüentemente, a ativação da cascata de proteínas. Sendo assim, tais anticorpos monoclonais agem sobre a inibição da proliferação celular e indução de apoptose [4].

Por apresentar um prognóstico ruim somado às grandes dificuldades no tratamento do câncer colorretal, pois muitos tumores são resistentes aos tratamentos convencionais, novas terapias são necessárias. Podendo, então, potencializar o tratamento farmacológico, devido a grande heterogeneidade desses tumores. Outrossim, faz-se necessário aprofundar o entendimento da biologia e das características moleculares e vias de sinalização dos mesmos.

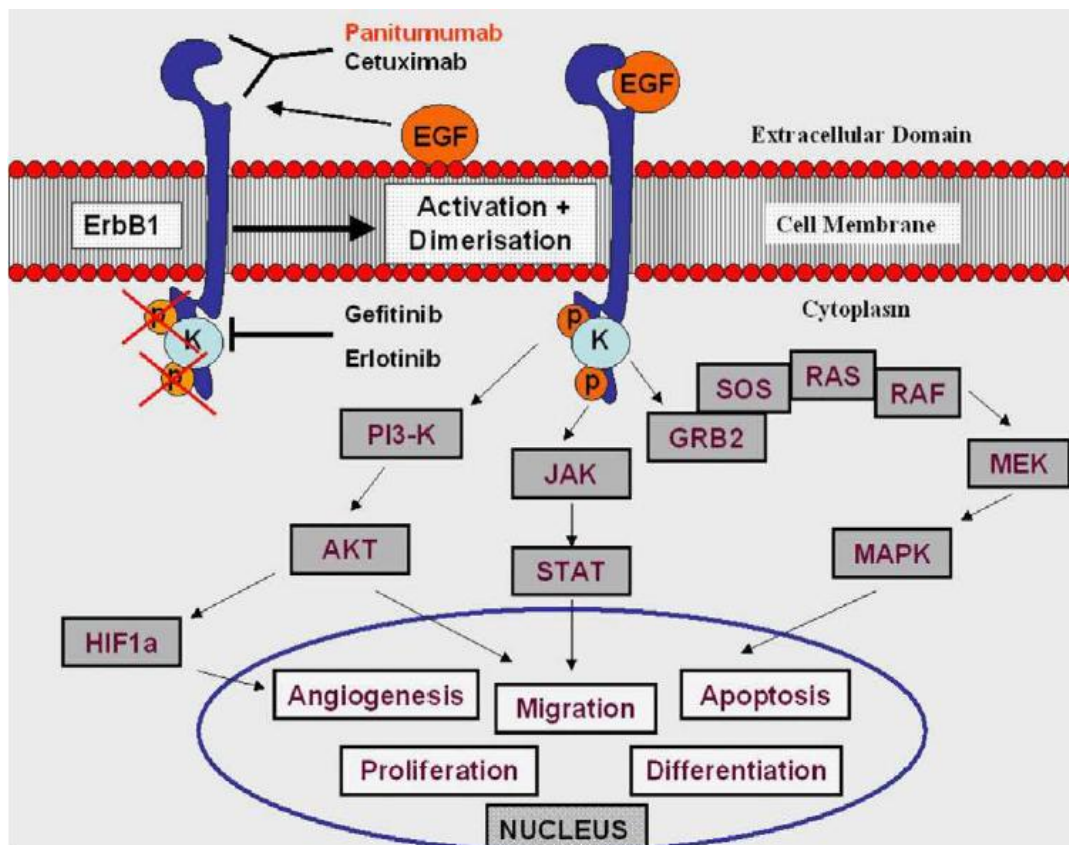


Figura 1. EGFR (ErbB1) e suas vias de sinalização [5].

## Neurotrofinas e seus receptores

Receptores tirosina quinases (RTKs, *receptor tyrosine kinase*) são proteínas da superfície celular que constituem alvos importantes para o tratamento do câncer.

Quando ativados por fatores de crescimento, estimulam vias de sinalização intracelular que controlam a sobrevivência e a proliferação celular [6]. TrkA, TrkB e TrkC são receptores quinase relacionados a tropomiosina (Trk, *tropomyosin-related receptor kinase*) que fazem parte da família de RTKs [7]. Seus ligantes são as neurotrofinas: fatores de crescimento estruturalmente relacionados que atuam na sobrevivência, diferenciação, proliferação e manutenção das populações neuronais [8]. Essa família é formada por Fator de Crescimento Neural (NGF, da sigla em inglês *Neural Growth Factor*), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, da sigla em inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*), e ainda, Neurotrofina-3 (NT-3) e Neurotrofina-4 (NT-4). NGF se liga especificamente a TrkA, BDNF e NT-4 se ligam especificamente a TrkB e NT-3 se liga especificamente a TrkC.

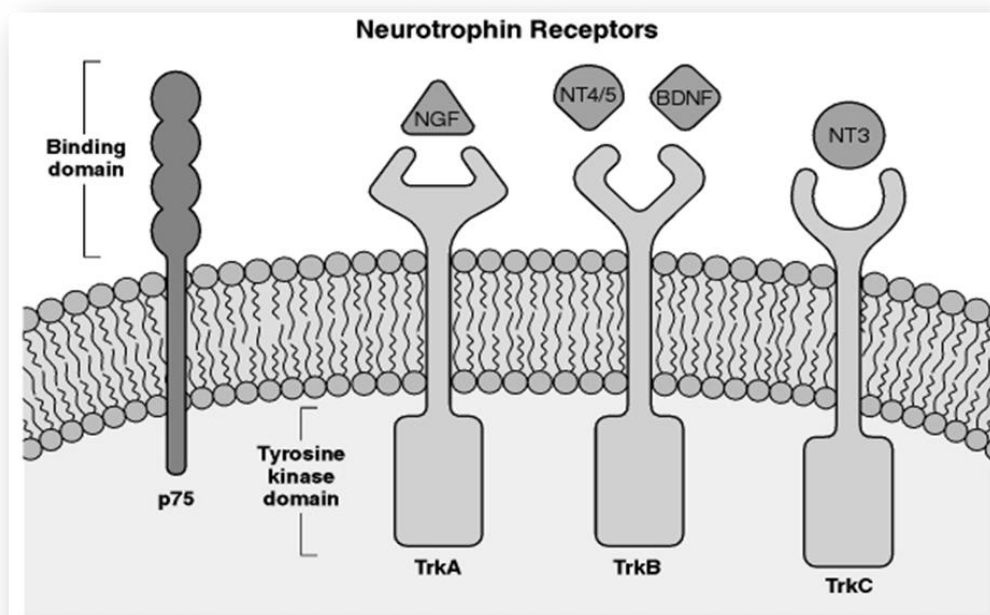


Figura 2. Neurotrofinas e seus receptores.

Além da função fisiológica, as neurotrofinas também desempenham um papel patológico associado a neoplasias, podendo aumentar ou suprimir o crescimento tumoral dependendo do tipo de tumor a que se relacionam [8]. Esta relação com o seguimento do tumor pode estar vinculada à ativação de cascatas de sinalização

celular desencadeada pelos receptores Trks, dentre as quais MAPK/ ERK e PI3K, que estão grandemente envolvidas em processos oncogênicos [4]. Assim sendo, tanto um aumento nos níveis de neurotrofinas ou Trk como uma sinalização desregulada via Trk pode levar à tumorigênese.

O BDNF atua fisiologicamente como fator de crescimento no desenvolvimento do sistema nervoso ao ativar seu receptor TrkB [9, 10]. Evidências recentes indicam que a sinalização de Trk pode exercer um importante papel na progressão tumoral. Vários estudos também já mostraram uma expressão alterada de Trks em diferentes tipos de tumor, e possíveis correlações entre a expressão do receptor e o prognóstico da doença estão sendo verificadas. Já é relatado que pacientes com neuroblastoma onde os tumores tem níveis aumentados de TrkA e TrkC, têm um melhor prognóstico e, em contrapartida, os que tem níveis aumentados de TrkB e seu ligante primário, BDNF, tem um pior prognóstico [11- 13].

Evidências de que a via de sinalização BDNF / TrkB pode estar envolvida no crescimento celular, metástase e resistência à terapia têm sido recentemente relacionadas a diversos outros tipos de câncer, incluindo tumores de tecidos não-neuronais, tais como câncer de colo uterino e de mama [13- 17].

### **Resistência e via do EGFR / TrkB em câncer colorretal**

Resultados do nosso grupo de pesquisa forneceram a primeira evidência de que BDNF/ TrkB possa desempenhar um papel na progressão da linhagem celular HT-29 de câncer colorretal e esteja envolvido em mecanismos de resistência a drogas antitumorais atuando em conjunto a GPCRs (GPCRs, do inglês *G protein-coupled receptors*) [15, 16]. Na última década, tem sido demonstrado que Receptores acoplados à proteína G são capazes de utilizar tanto o Fator de Crescimento epidérmico (EGF) quanto seu receptor (EGFR) como sinalização intermediária para regular o crescimento, diferenciação e migração celular; e os efeitos combinados com um antagonista de GRPR a um inibidor de EGFR demonstraram um efeito antitumoral pronunciado.

A identificação dos mecanismos adicionais de resistência pode revelar novos caminhos para aumentar a efetividade de inibidores de EGFR e fornecem uma base racional para a investigação de combinações de agentes que inibem BDNF/ TrkB em

conjunto com um inibidor de EGFR. Em trabalhos anteriores, investigamos a expressão de mRNA de BDNF e TrkB após 10h de tratamento com cetuximabe. Vimos que a dose de cetuximabe capaz de inibir a proliferação das células HT-29 (10nM) reduziu cerca de 50% as expressões de mRNA de BDNF e TrkB, enquanto que a dose de cetuximabe 0,1nM não demonstrou o mesmo resultado, sugerindo que o efeito inibitório de cetuximabe em células de câncer colorretal possivelmente envolva a inibição de BDNF / TrkB. Em nosso trabalho avaliamos, ainda, a adição de BDNF humano recombinante (10ng/ mL) a cetuximabe em células HT-29. Identificamos que BDNF tanto foi capaz de bloquear o efeito induzido por cetuximabe (10nM) quanto induzir proliferação celular, quando avaliado pelas técnicas de contagem celular por exclusão com azul de Tripán, MTT e ensaio clonogênico. Os resultados evidenciam que BDNF protege as células de câncer colorretal dos efeitos inibitórios de cetuximabe.

Com os achados anteriores que reforçaram a ideia de que haja uma relação entre EGFR e Trks, examinamos se o bloqueio de TrkB poderia potencializar o efeito de cetuximabe. Para tanto, as células HT-29 foram tratadas com uma dose não efetiva de cetuximabe (0,1nM) ou uma dose ineficaz de um inibidor não seletivo de Trks, K252a (10nM) ou ambos, seguido pela adição de BDNF (10ng/ mL), através da técnica de MTT. Cetuximabe ou K252a isolados não afetaram a proliferação celular, porém quando administrados em combinação reduziram a proliferação celular. Entretanto, este efeito foi completamente abolido pela adição de BDNF, que por si só não afetou a proliferação. Este resultado sugere que a inibição de TrkB pode potencializar o efeito inibitório de cetuximabe em câncer colorretal.

Nossos resultados forneceram a primeira evidência de que a resistência a cetuximabe em câncer colorretal pode estar relacionada com a sinalização BDNF / TrkB / EGFR, sugerindo que a interferência na via do BDNF / TrkB possa se tornar um potente agente antitumoral. Isso pode ser verificado em nosso artigo publicado citado em anexo [18].

Tendo verificado o importante papel da via de sinalização BDNF / TrkB no câncer colorretal e os processos de resistência celular como um dos limitantes do sucesso da terapêutica, é preciso aprofundar o conhecimento desses mecanismos, bem como elucidar seus funcionamentos para que o sucesso no tratamento do câncer de cólon e reto e de outros tumores possa ser plenamente alcançado.

## **OBJETIVOS**

O objetivo do presente trabalho foi induzir resistência à cetuximabe em células, para analisar e comparar células HT-29 normais (controle) com células resistentes, verificando a expressão do mRNA de BDNF, TrkB e EGFR, a fim de avaliar o efeito do ligante primário do receptor TrkB, BDNF, o efeito do ligante do receptor EGFR, EGF, bem como o inibidor de Trk, K252a, sozinho ou em combinações. Além de investigar se ocorre dano no DNA nessas células.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Cultivo celular e tratamentos**

Para o presente trabalho foi utilizada a linhagem celular de câncer colorretal humana, HT-29, obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, EUA), que já estava disponível no Laboratório de Pesquisas em Câncer no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As células foram mantidas em frascos de cultura de 25cm<sup>3</sup> em incubadora com atmosfera de 5% de gás carbônico, a temperatura de 37°C, com umidade relativa mínima de 95%, contendo 4mL de meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Gibco) com adição de 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS; Sorali, Campo Grande, Brasil), 0,1% de fungizona, 0,125% de gentamicina e 1% de ampicilina[16].

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços numa densidade de  $7 \times 10^3$  células por poço, em, no mínimo, triplicata, em crescimento exponencial, e mantidas em meio RPMI 1640, suplementado, mantidas sob incubação por 24 horas.

Após 24 horas, as células foram tratadas com Cetuximabe (Erbix, C225, Merck, Darmstadt, Alemanha; 0,5mg/mL, 1,0mg/mL e 2,0mg/mL) e K252a (Sigma-Aldrich, St Louis, USA; 10nM, 100nM e 1000nM). Após 48 horas do plaqueamento das células, tratou-se com BDNF humano recombinante (10ng/mL), EGF (2mg/mL), associados ou não a K252a.

As doses dos tratamentos foram escolhidas com base em estudos prévios [14].

### **Indução de resistência à cetuximabe em células HT-29**

Para a indução de resistência à cetuximabe, semanalmente as células foram plaqueadas com densidade de  $4 \times 10^5$  células, e iniciou-se a indução à resistência adicionando-se uma dose não efetiva de cetuximabe no frasco (0,3 mg/mL), e observou-se a proliferação das mesmas. Conjuntamente plaqueamos um frasco de células controle com a mesma quantidade de células.

Após 16 dias, foi realizado tratamento semanal de 1,0 mg/mL em frasco com a mesma densidade de células. Nas primeiras semanas, o crescimento foi afetado, mas após, aproximadamente, 4 semanas, as células exibiram crescimento similar ao controle, e, a partir daí, os experimentos foram realizados.

### **Método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)**

Para avaliar a citotoxicidade e a viabilidade celular, foi utilizada a análise colorimétrica com o corante MTT (5mg/mL) que na forma oxidada possui coloração amarela, porém, quando reduzido, desenvolve coloração azul. Essa redução é produzida por desidrogenases mitocondriais de células ditas viáveis [19].

Após 72 horas, isto é, ao final do tratamento, 11µL de uma solução de MTT (5mg/mL) foi adicionada em cada poço, seguida de uma incubação de 3 horas a 37°C. Após, o meio foi cuidadosamente removido e as placas foram mantidas à temperatura ambiente até estarem completamente secas, e então adicionou-se 50µL de dimetil sulfóxido (DMSO) a cada poço e fez-se imediatamente a leitura em leitor de ELISA no comprimento de onda de 492nm.

### **Contagem celular com exclusão por Azul de Tripam**

Após 72h de tratamento, o meio foi totalmente removido, as células foram lavadas com HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) e procedeu-se a adição de Tripsina/EDTA 0,25% para separar (soltar) as células. Após, uma alíquota de 10 µL da solução celular foi misturada com igual quantidade de Azul de Tripam 0,4%, homogeneizado e colocado em câmara de Neubauer para imediatamente proceder a contagem em microscópio óptico [15].

### **Análise da expressão de mRNA por RT-PCR**

O RNA total das células humanas HT-29 foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante, e o transcrito reverso com Superscript™ III First-Strand Synthesis SuperMix® (Invitrogen, USA).



Os primers de  $\beta$ -actina, BDNF, EGFR e TrkB foram desenhados de acordo com a sequência do *Gene Bank* como segue:  $\beta$ -actina, 5'-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3' (*forward*) e 5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-3' (*reverse*); BDNF, 5'-GCGTGAATGGGCCCAAGGCAGG-3' (*forward*) e 5'-TGTGACCGTCCCGCCCGACATG-3' (*reverse*); EGFR, 5'-TAACAAGCTCACGCAGTTGG-3' (*forward*) e 5'-GTTGAGGGCAATGAGGACAT-3' (*reverse*); TrkB, 5'-TGGTGCATTCCATTCACTGT-3' (*forward*) e 5'-CGTGGTACTCCGTGTGATTG-3' (*reverse*). A expressão de  $\beta$ -actina foi utilizado como controle interno.

Os experimentos de PCR foram feitos com 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.1  $\mu$ M de cada primer, 0.2 mM de nNTPs, 1U Taq Platinum® (Invitrogen, USA) e 2  $\mu$ L cDNA da amostra. As condições da reação de PCR foram feitas em um volume total de 15  $\mu$ L usando: 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.1  $\mu$ M para cada primer, 0.2 mM dNTPs, 1U Taq Platinum (Invitrogen) e 1  $\mu$ L de cDNA.

A amplificação consistiu de 1 minuto de desnaturação inicial a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos primers a 60°C por 20 segundos extensão, a 72°C por 45 segundos, e seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de  $\beta$ -actina (190 pb), BDNF (362 pb), EGFR (190 pb) e TrkB (190 pb) foram aplicados em um gel de agarose 1% seguindo a técnica de eletroforese, corados com brometo de etídio e visualizados com iluminação ultravioleta. A expressão relativa de  $\beta$ -actina, BDNF, EGFR e TrkB foram determinados por densitometria usando o programa ImageJ 1.37 para Windows.

### **Ensaio cometa alcalino**

Inicialmente, 10  $\mu$ L de solução celular foi colocada sobre lâmina contendo agarose *Low melting* e cobertas por lamínula, sendo imediatamente incubadas em solução de lise a 4°C, por, no mínimo, 24h, para remover proteínas celulares e membranas. Após o procedimento de lise, as lâminas foram colocadas em cuba e realizou-se eletroforese horizontal a aproximadamente 4°C, com auxílio de tampão. Este passo visa a possibilitar o desenrolamento das fitas de DNA. A eletroforese foi

realizada durante 20 minutos a 25 V e 300 mA sob luz vermelha no escuro para evitar danos adicionais ao DNA.

As lâminas foram então neutralizadas, lavadas e coradas, e deixadas secando a temperatura ambiente por no mínimo 24 horas. Por fim procedeu-se análise visual por meio de um microscópio óptico. As células foram pontuadas visualmente em cinco classes de acordo com o comprimento da cauda: classe 0: sem danos, sem cauda; classe 1: com uma cauda mais curta do que o diâmetro da cabeça (núcleo); classe 2: com um comprimento da cauda de 1-2 vezes o diâmetro da cabeça, classe 3: com uma cauda superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; e classe 4: cometas sem cabeças [21].

### **Análise estatística**

Os dados estão representados por valores de porcentagem de viabilidade celular +/- erro padrão (EP). A diferença entre os valores foi avaliada por análise de variância de uma via *One-Way* (ANOVA) seguida do teste *Tukey post hoc*, utilizando o software para cálculos estatísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Os asteriscos nos gráficos representam diferenças significativas entre o grupo teste e o grupo controle. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## RESULTADOS

### Tratamento a longo prazo com cetuximabe resulta em células resistentes

Para induzir resistência, as células HT-29 foram tratadas inicialmente com uma dose não efetiva do fármaco (0,3mg/mL), e após 16 dias procedeu-se o tratamento com dose efetiva (1,0mg/mL), realizando o plaqueamento das células a cada 4 dias e tratando-as a cada 7 dias. Por fim executamos uma curva de dose nas células controle e resistentes. As células resistentes demonstraram perfil diferenciado significativo frente ao tratamento.

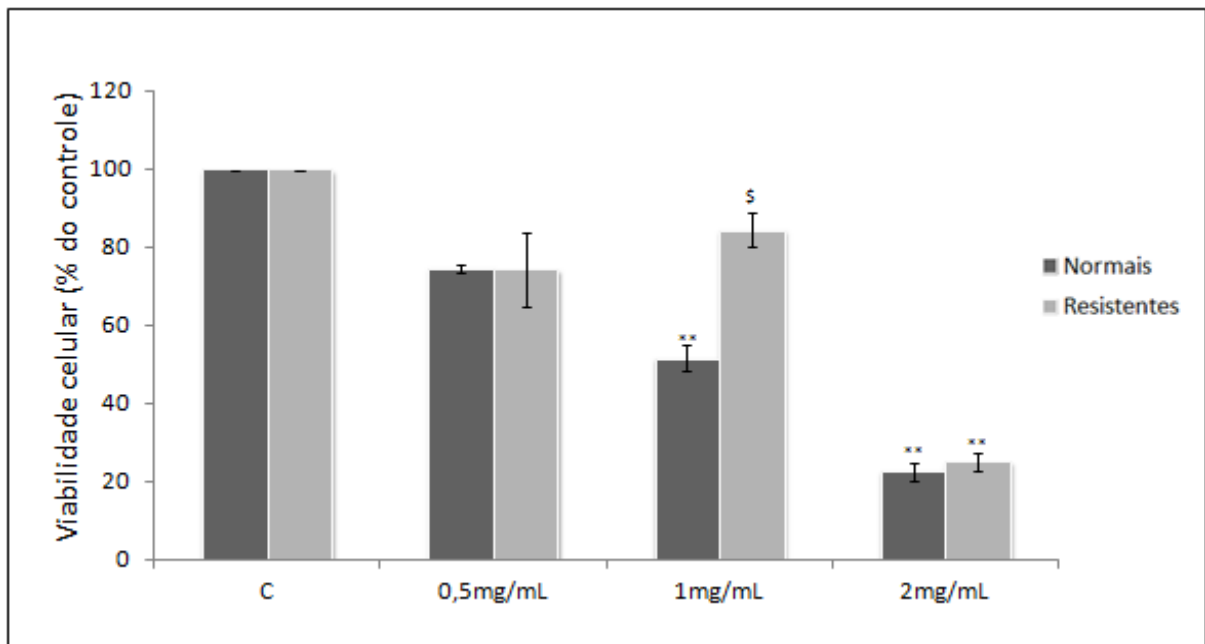


Figura 3. Perfil de viabilidade celular. Células HT-29 tratadas com Cetuximabe (0,5mg/mL, 1mg/mL e 2mg/mL) por 72 horas, pela técnica de contagem celular por exclusão com Azul de Tripam. \*  $p < 0,05$  comparativamente com o controle; \$  $p < 0,05$  diferença entre doses iguais nas células normais e resistentes.

### Células HT-29 resistentes a cetuximabe respondem igualmente ao tratamento com K252a comparadas a células normais

Ao realizar curva de dose com inibidor de TRKs, K252a, verificou-se por MTT que a dose efetiva (1000nM) reduziu significativamente a viabilidade celular tanto das células normais quanto das resistentes. Este resultado indica que tratamento a longo prazo com anticorpo monoclonal antagonista de EGFR, cetuximabe, afeta a

via BDNF / TrkB, podendo ainda estar envolvido com outros processos celulares. Portanto, há um forte indicativo de que processos de resistência em células de câncer colorretal estejam relacionados com a via de sinalização BDNF / TrkB.

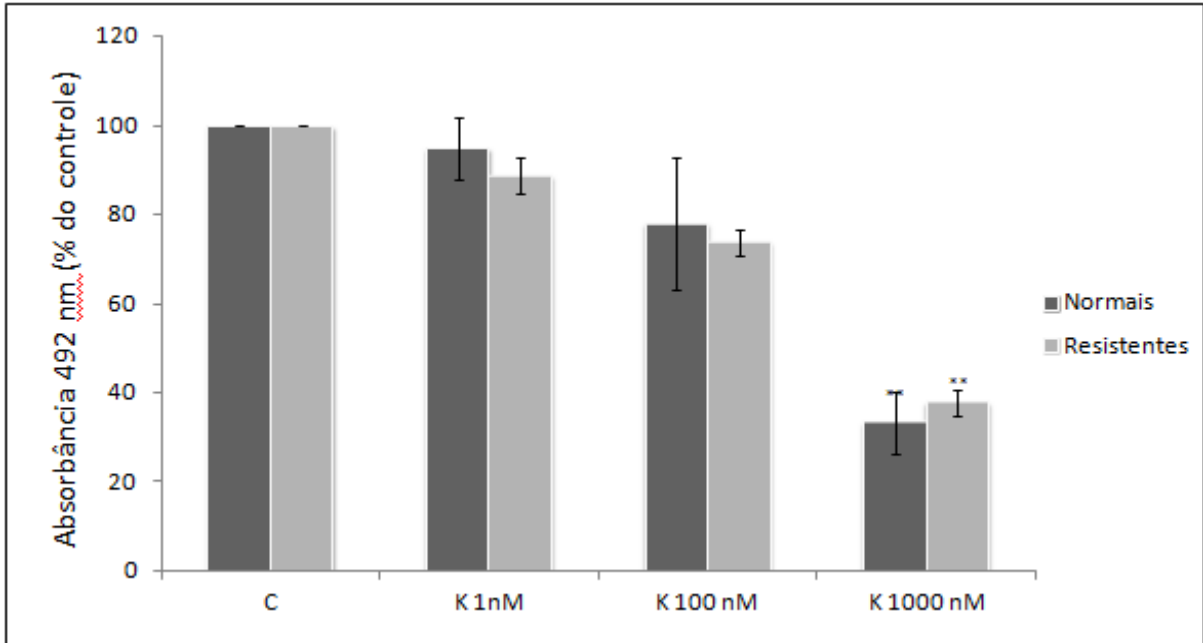


Figura 4. Perfil de viabilidade celular. Células HT-29 tratadas com K 252a (1nM, 100nM e 1000nM) por 72 horas, pela técnica de MTT. \*  $p < 0,05$  comparativamente com o controle.

### **Células resistentes demonstraram diferenças na expressão de mRNA de BDNF, TrkB e EGFR**

Após extração de RNA das células e preparação do cDNA, realizou-se RT-PCR das amostras e foi possível observar que as células resistentes tiveram diminuição significativa da expressão de BDNF e TrkB quando comparou-se células HT-29 normais e resistentes entre si. A expressão do receptor TrkB também foi significativamente diminuída frente ao controle (actina). Ao contrário destes, EGFR não teve sua expressão diminuída nas células resistentes, pelo contrário, foi aumentada ainda que não de modo significativo; entretanto foi significativa a diminuição da sua expressão comparada ao controle, podendo ser verificado o mesmo resultado para as células normais. Estes resultados sugerem que a indução de resistência diminui BDNF e TrkB, sugerindo que essa via está envolvida com a indução de resistência.

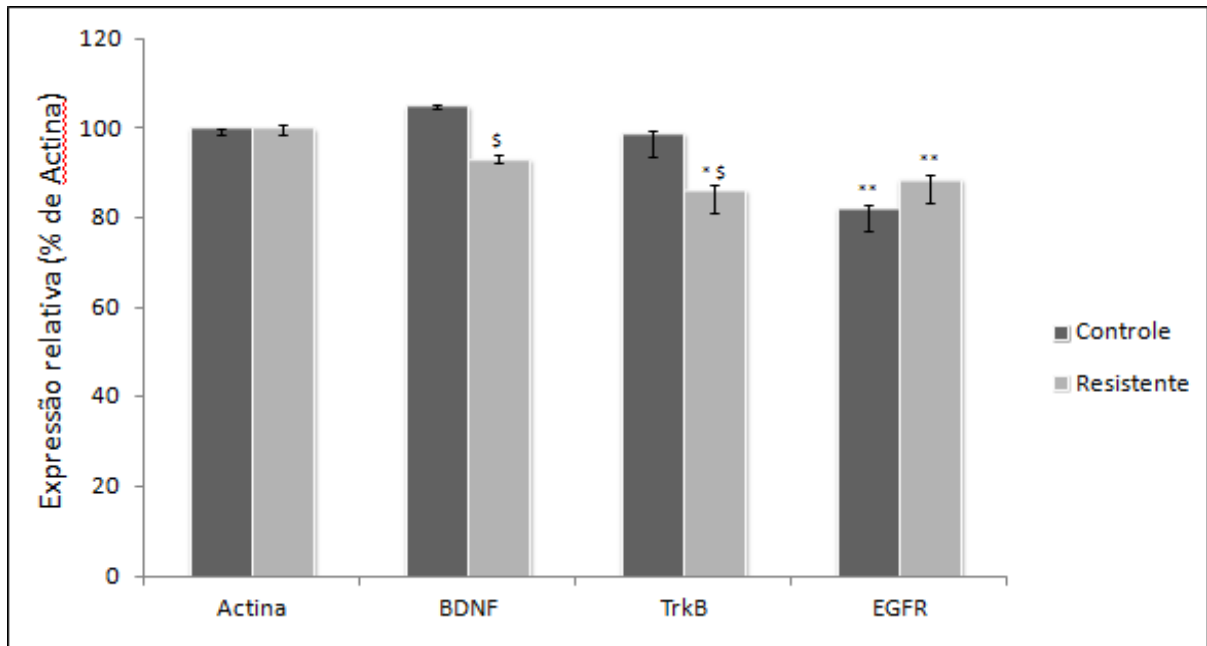


Figura 5. PCR semi-quantitativo. Expressão de mRNA para Actina, BDNF, TrkB e EGFR. \*  $p < 0,05$  comparativamente com o controle. \$  $p < 0,05$  diferença de expressão nas células normais e resistentes.

### **BDNF e EGF não são capazes de reverter o efeito antiproliferativo de K252a**

Após visualizar uma similar diminuição da viabilidade celular de K252a nas células HT-29 controle e resistentes, pela técnica de contagem celular por exclusão com Azul de Tripam foram testados co-tratamentos, com BDNF ou EGF, e o resultado foi negativo para ambos, demonstrando que esses ligantes não são capazes de reverter o efeito do inibidor de TRKs. Ao efetuar o tratamento com BDNF, este não afetou a viabilidade celular comparado ao controle; outrossim ao comparar o efeito da adição de EGF nas linhagens, nas células normais houve um aumento significativo da viabilidade celular, o que não foi observado nas células resistentes, indicando que processos de resistência afetam o ligante e/ou o receptor.

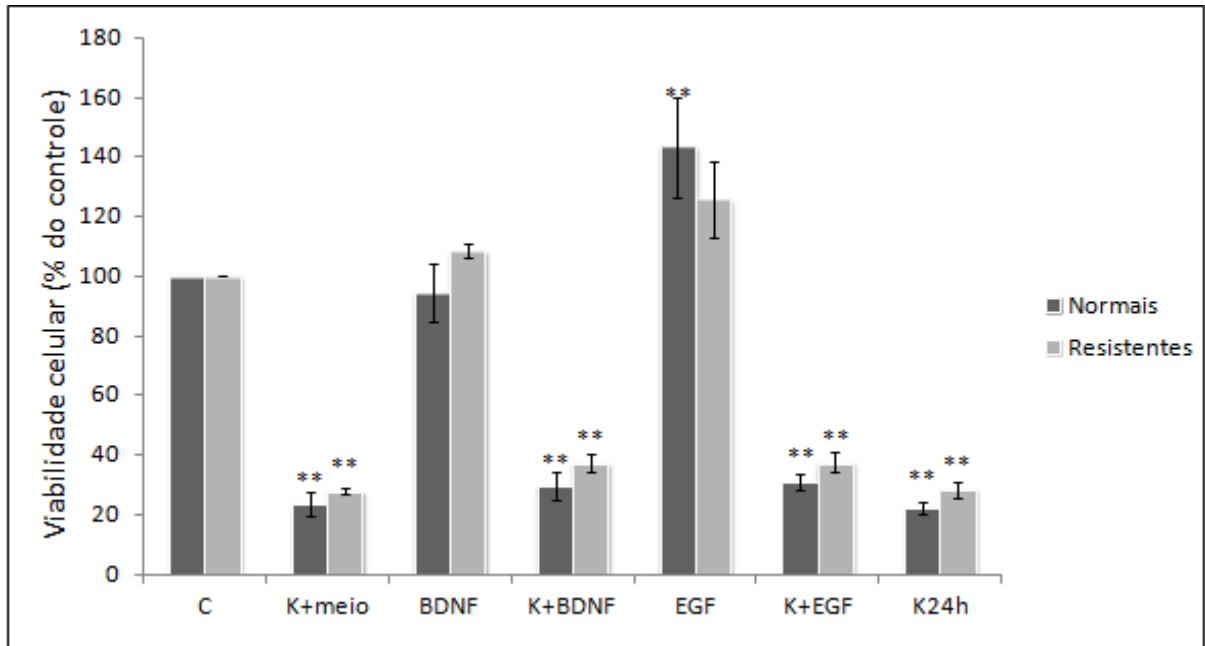


Figura 6. Perfil de viabilidade celular. Células HT-29 tratadas com K 252a (1000nM) por 24 horas. Células HT-29 tratadas com K 252a (1000nM) por 24 horas, seguido pelo co-tratamento de BDNF (10ng/mL) ou EGF (2mg/mL) ou meio de cultura RPMI com 10% soro bovino por 48 horas. Células HT-29 tratadas com BDNF (10ng/mL) ou EGF (2mg/mL) por 48 horas. Técnica de contagem celular por exclusão com Azul de Tripam. \*  $p < 0,05$  comparativamente com o controle.

### **Células HT-29 normais e resistentes não exibem diferenças ao analisar dano ao DNA**

O ensaio cometa alcalino foi utilizado como ferramenta para verificar dano ao DNA nas células, normais e resistentes. Não exibiu diferenças estatisticamente significantes; nas células resistentes ocorreram mais danos 2 e 3, bem como a classificação zero, enquanto que a quantidade de danos 1 e 4 foram praticamente os mesmos em ambas. Estes resultados indicam que danos no DNA não estão envolvidos em processos de resistência.

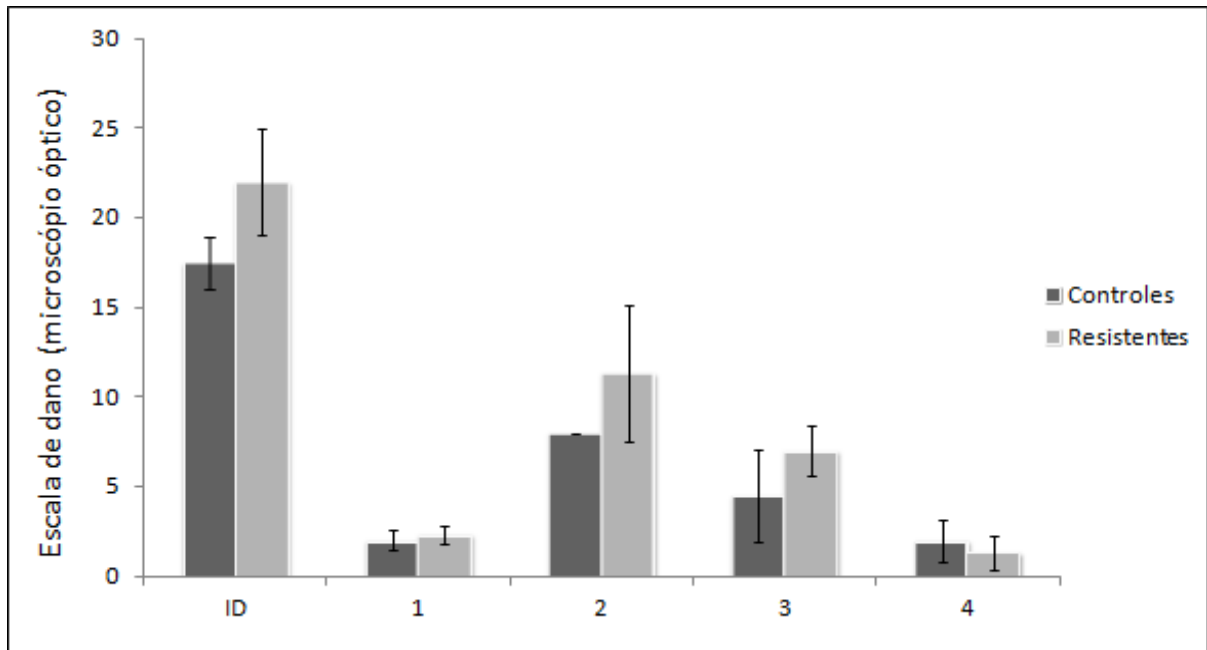


Figura 7. Análise por microscopia óptica. Quantidade de células visualizadas apresentando danos no DNA conforme escala descrita em materiais e métodos.

## DISCUSSÃO

Sendo a resistência aos anticorpos monoclonais com alvo ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) uma limitação ao tratamento do câncer colorretal, um entendimento mais amplo e aprofundado dos mecanismos envolvidos nesses processos certamente ajudará numa maior efetividade dos tratamentos deste tipo de neoplasia.

Durante anos as neurotrofinas e TRKs foram alvos de estudos como moléculas presentes no sistema nervoso envolvidas na plasticidade sináptica e sobrevivência neuronal [20]. Em tumores neurais, como por exemplo, neuroblastoma, a função da sinalização BDNF / TrkB tem sido bem elucidada, podendo também promover a resistência à quimioterapia nestes tumores.

Em câncer de cólon e reto tem sido observadas mutações em importantes vias de sinalização, tais como KRAS, BRAF, PI3K, entre outras. Por isso, investigar essas vias principais é de grande urgência para poder ter uma maior efetividade no tratamento dessa doença. Uma dessas vias, KRAS mutante, está envolvida com resistência a cetuximabe em pacientes com câncer colorretal metastático [18]. Neste trabalho, investigamos processos de resistência ao anticorpo monoclonal cetuximabe em linhagem HT-29 de células de câncer colorretal humano.

Nosso grupo de pesquisas já havia demonstrado que a neurotrofina prototípica BDNF pode proteger contra os efeitos de cetuximabe no crescimento celular, e a inibição do seu receptor, TrkB, aumentou a sensibilidade do cetuximabe. Portanto, resolvemos investigar em células normais e em células comprovadamente resistentes se a resposta a este tipo de inibição se mantém, o que foi confirmado, demonstrando que células sob tratamento prolongado com inibidor de EGFR responde igualmente ao inibidor de TRKs, K252a, o que indica que a via BDNF / TrkB exibe comportamento semelhante nas células controle e nas células resistentes a cetuximabe. Por isso, investir na terapia com K252a para tratar tumores de cólon e reto resistentes à terapia pode trazer importantes avanços na terapêutica. Portanto a busca do uso de inibidores de TRKs deve continuar sendo utilizada como uma alternativa aos tratamentos convencionais, mesmo porque em ensaios clínicos tem demonstrado ser bem tolerado, a despeito de sua possível ação em outros tecidos



[13, 14].

Ao avaliar a expressão de BDNF e dos receptores TrkB e EGFR, verificamos que houve diminuição de BDNF nas células resistentes. Visto que as células normais expressam mais BDNF como mecanismo de defesa frente ao tratamento, esse achado pode ser uma importante ferramenta na terapêutica, pois nas células resistentes esse mecanismo pode estar suprimido. Em paralelo, EGFR teve sua expressão constante em ambas as células, podendo ser um indicativo de que na ativação do processo de resistência, a célula continue expressando este receptor tirosina quinase normalmente. E é possível que outros mecanismos de resistência como eliminação de drogas (efluxo), dessensibilização do receptor, etc, pode estar envolvido com esse processo.

Tanto as células normais quanto resistentes responderam negativamente aos co-tratamentos de K252a com EGF e BDNF. Investigando a via BDNF / TrkB, vimos que o K252a continua sendo efetivo em ambas as células. Verificamos que este pode ser no futuro um potente agente antitumoral, embora BDNF e EGF não tenham revertido esse efeito. Com isso vemos que essa via deve ser mais estudada. Também foi possível ver que dano ao DNA não interfere em resistência.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Concluimos que a via BDNF / TrkB está ativamente envolvida com processos de resistência a cetuximabe, envolvendo expressão gênica. O uso de inibidor de Trk deve continuar sendo testado como alternativa aos tratamentos convencionais, visto que K 252a demonstrou possuir resposta inclusive em células resistentes. Porém, faz-se necessário aprofundar os conhecimentos desta e de outras vias de sinalização envolvidas no câncer, bem como do funcionamento da resistência celular a fármacos.

Como K252a não é específico, ou seja, age tanto em TrkB quanto TrkA e TrkC, estudar outras neurotrofinas relacionadas a esses receptores é importante para o entendimento desses fatores na fisiologia celular do câncer colorretal.

A caracterização das principais vias envolvidas nestes processos é bastante necessária, bem como o uso de seus respectivos inibidores. Sabe-se que há uma importante relação entre inibidores de GRPR e BDNF / TrkB no câncer, e possivelmente serão vistos importantes resultados ao analisar essa relação em células resistentes. Além da expressão gênica, possivelmente a análise de proteínas por *western blotting* fornecerá respostas que corroborem com os achados já mencionados. Essas e outras investigações certamente contribuirão para uma resposta cada vez mais significativa no tratamento (e na busca da cura) do câncer e de outras doenças.

## REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2013. (<http://www.inca.gov.br>)
2. Guimarães, J. R. Q. *Manual de Oncologia*. 2.ed. São Paulo: BBS Editora, 2006.
3. Waldner, M. J.; Neurath, M. F. The molecular therapy of colorectal cancer. *Molecular Mechanisms and New Therapeutic Targets in Human Carcinogenesis*. V. 13, p. 171-178, 2010.
4. de Farias, C. B. BDNF/ TrkB em câncer colorretal: interações funcionais com GRPR e EGFR. Tese de doutorado/ Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular UFRGS, 2012.
5. Freeman, D. J.; McDorman, K.; Bush, T. Mono and combination therapeutic activity of panitumumab (ABX-EGF) on human A431 epidermoid and HT-29 colon carcinoma xenografts; correlation with pharmacodynamic parameters. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 27-31, 2004.
6. Krause D. S.; Van Etten, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 353: 172-187, 2005.
7. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol* 25:1386-1403, 1994.
8. Krüttgen, A.; Schneider, I.; Weis, J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Int. Soc. Neurophatol Brain Phatol*, 16: 304-310, 2006.
9. Wong, A. S; Leung, P. C. Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *J. Obstet Gynecol Res* 33:3-16, 2007.
10. Lewin, G. R.; Barde, Y. A. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosc* 19: 289-317, 1996.
11. Nakagawara, A.; Arima- Nakagawara, M; Scavarda, N. J.; Azar, C. G.; Cantor, A. B.; Brodeur, G. M. Association between high levels of expression of the TRK gene on favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328: 847-854, 1993.
12. Nakagawara, A.; Scavarda, N. J.; Azar, C. G.; Brodeur, G. M. Expression and function of TrkB and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 14: 759-767, 1994.

13. Thiele, C. J.; Li, Z.; McKee, A. E. On Trk- the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 15: 5962-5967, 2009.
14. Desmet, C. J.; Peeper, D. S. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 63: 755-759, 2006.
15. de Farias, C. B.; Rosemberg, D. B.; Heinen, T. E.; Koehler-Santos, P.; Abujamra, A. L.; Kapczinski, F.; Brunetto, A. L.; Ashton-Prolla, P.; Meurer, L.; Bogó, M.; R.; Damin, D. C.; Schwartsmann, G.; Roesler, R. BDNF/ TrkB content an interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology* 79: 430-439, 2010.
16. Cornelio, D. B.; de Farias, C. B.; Prusch, D. S.; Heinen, T. E.; dos Santos, R. P.; Abujamra, A. L.; Schwartsmann, G.; Roesler, R. Influence of GRPR and BDNF/ TrkB signaling on the viability of breast and gynecologic cancer cells. *Molecular and Clinical Oncology*, v.1: 148-152, 2013.
17. de Farias, C. B.; Heinen, T. E.; dos Santos, R. P.; Abujamra, A. L.; Schwartsmann, G.; Roesler, R. BDNF/ TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 425(2):328-332, 2012.
18. Peres, C. M.; Curi, R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
19. de Melo, F. T.; de Oliveira, I. M.; Greggio, S.; Dacosta, J. C.; Guecheva, T. N.; Saffi, J.; Henriques, J. A. P.; Rosa, R. M. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 50 3548-3555, 2012.
20. Huang, E. J.; Reichardt, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72 609-642 (2003).