

Larissa Milano¹, Temenouga Guecheva¹, Jenifer Saffi^{1,2}

¹Departamento de Biofísica, UFRGS, Porto Alegre, RS

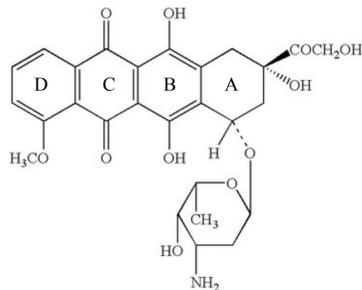
²Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UFCSPA, Porto Alegre – RS

INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX, Fig. 1) é uma droga antitumoral pertencente a família das antraciclina comumente utilizada no tratamento de câncer de mama e linfomas. O mecanismo de ação da DOX inclui interação com a enzima Topoisomerase II formando um complexo ternário com essa e com o DNA, além de geração de radicais livres dentro da célula. Lesões induzidas por estes agentes, são geralmente removidas pelo reparo por excisão de nucleotídeos (NER). O objetivo desse trabalho é avaliar indução e reparo de danos oxidativos no DNA de linhagens de fibroblastos humanos proficientes (MRC5) e deficientes (XPD) em NER após tratamento com DOX.

Figura 1. Estrutura química da doxorubicina.

Constituição básica de uma antraciclina, a qual possui os quatro anéis aromáticos (A, B, C e D), assim como um açúcar ligado a posição 7 do anel A.



MATERIAIS E MÉTODOS

As linhagens celulares XPD e MRC5 foram rotineiramente cultivadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ em meio Dulbecco modificado por Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino, e 1% antibiótico e antimicótico. A cinética de reparo (Figura 4) do dano induzido no DNA foi avaliada em teste cometa após tratamento de 3h seguido por de 3, 24 e 48 horas de pós-incubação. O teste cometa modificado com enzimas específicas FPG e ENDO III, que aumentam a sensibilidade do teste detectando lesões específicas (Figura 2). Os danos oxidativos no DNA induzidos por DOX foram avaliados em tratamento de 24h (Figura 3). A cinética do reparo das quebras está apresentada na Figura 4. A formação de radicais livres (Figura 5) foi observada em microscópio de fluorescência mediante incubação com dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCF-DA).

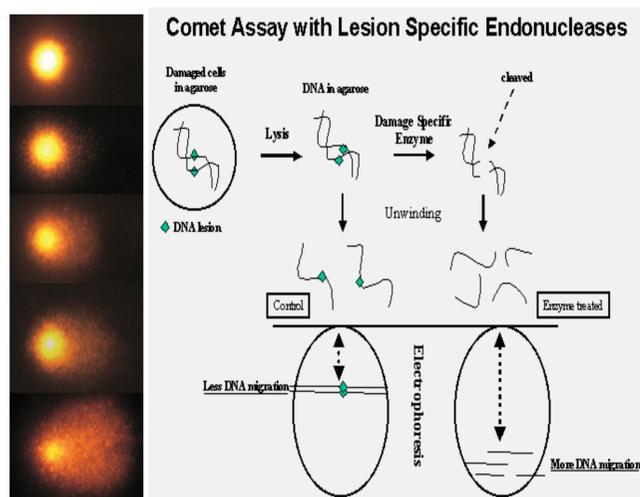


Figura 2. Teste cometa com enzimas específicas - Formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG) e endonuclease III (Endo III) são as enzimas mais comumente usadas para detectar danos oxidativos, específicos para purinas ou pirimidina oxidadas, respectivamente.

RESULTADOS

No ensaio cometa (Figura 3), detectou-se aumento na migração do DNA nas duas linhagens, indicando a formação de quebras diretas ou em consequência das lesões oxidativas causadas por DOX. Este aumento foi significativo em relação ao controle não tratado após tratamento com 0.6 µg/mL de DOX. Os resultados do ensaio cometa revelaram aumento na migração do DNA, indicando a formação de quebras, de forma dose-dependente. Não foi detectada diferença na indução de dano por DOX e na cinética do reparo entre as duas linhagens (Figura 4). Conforme visualização em microscopia de fluorescência (Figura 5), o tratamento com DOX induziu formação de radicais livres na dose mais alta (0.6 µg/mL) utilizada.

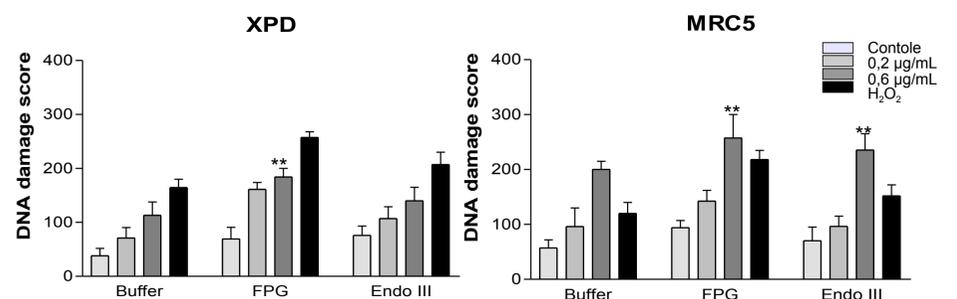


Figura 3. DOX induziu danos ao DNA de uma maneira dependente da dose. O escore de danos ao DNA no tratamento de DOX em fibroblastos XPD-deficiente e proficientes foi determinada pelo ensaio cometa.

Cinética de Reparo

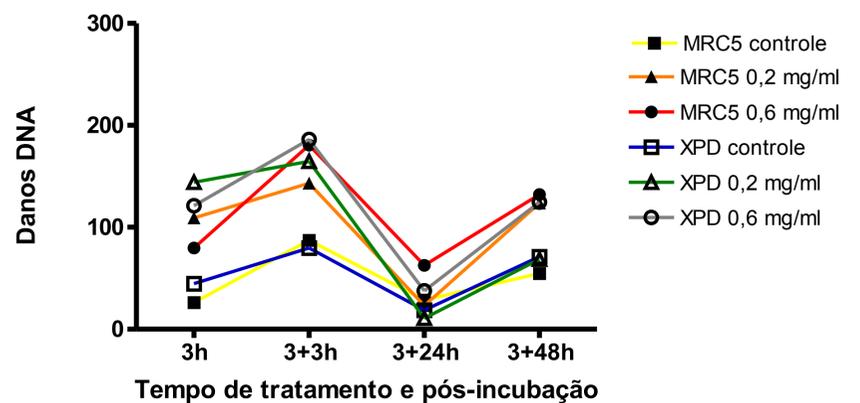


Figura 4. Cinética de reparo em fibroblastos humanos tratados com DOX. Células XPD (deficientes em NER) e MRC5 (proficientes em reparo) foram incubadas com DOX em concentrações 0.2 e 0.6 µg/mL por 3h. Em seguida as células foram lavadas com PBS e pós-incubadas em meio livre de droga por 3, 24 ou 48h.

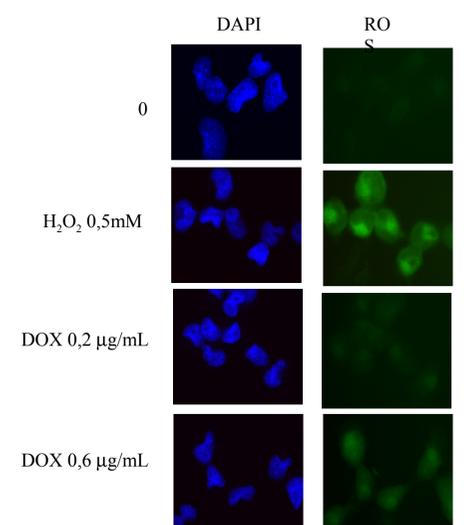


Figura 5. Determinação dos níveis intracelulares de ROS.

As células foram cultivadas em lamínulas, tratadas com DOX por 3h. Incubadas com 10 mM 2'-7'-diacetato dicloro-dihidro-fluoresceína em PBS morno suplementado com 5,5 mM de glicose. Após as células foram lavadas e fixadas em formalina 4%. Lamínulas foram incubadas com 1 mM 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Níveis intracelulares de ROS foram visualizados por meio de microscópio de fluorescência.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que as quebras no DNA após tratamento de 3h podem estar relacionadas com a indução de estresse oxidativo na dose mais alta utilizada da DOX. Não foi observada diferença significativa entre as células proficientes e deficientes em NER na indução de dano oxidativo ou na cinética de reparo do dano induzido por DOX, sugerindo que a indução de estresse oxidativo não é o principal fator responsável pela sensibilidade aumentada das células deficientes em XPD a DOX.