

Larissa Milano¹, Temenouga Guecheva¹, Guido Lenz¹, Jenifer Saffi^{1,2}

¹Departamento de Biofísica, UFRGS, Porto Alegre, RS

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

INTRODUÇÃO

As antraciclina Doxorubicina (DOX) e Daunorrubicina (DNR), agentes antitumorais utilizados em tratamentos de câncer de mama, tumores sólidos e leucemias. O mecanismo de ação dessas drogas inclui interação com a enzima Topoisomerase II, formação de adutos e pontes intercadeias no DNA, bem como indução de radicais livres dentro da célula, levando a senescência e a morte celular por apoptose ou necrose. O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é conhecido pela sua capacidade em remover lesões que levam a deformações estruturais importantes no DNA, como as induzidas por drogas antitumorais, assim como outros mecanismos de reparo de danos no DNA, tem sido largamente estudado com o objetivo de desenvolver novos alvos moleculares para a terapia antitumoral, uma vez que os mecanismos de reparo estão diretamente correlacionados com a resistência de muitos tumores às estratégias terapêuticas. Células deficientes em reparo normalmente apresentam uma sensibilidade alterada a agentes antitumorais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a citotoxicidade e a indução de morte celular por apoptose em linhagens de fibroblastos humanos proficientes (MRC5) e deficientes em NER (XPD, XPA, CSB) após tratamento com diferentes concentrações de DOX e DNR.

MATERIAIS E MÉTODOS

As linhagens celulares CSB, XPA, 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 citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de redução do sal tetrazolato (MTT) em tratamentos com diferentes concentrações DNR e DOX (entre 0,01 µg/ml e 1,6 µg/ml) por 72h. O ensaio de sobrevivência clonogênica foi realizado após 72h de tratamento com as drogas. A morte celular por apoptose celular foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com ANEXINA V FITC e

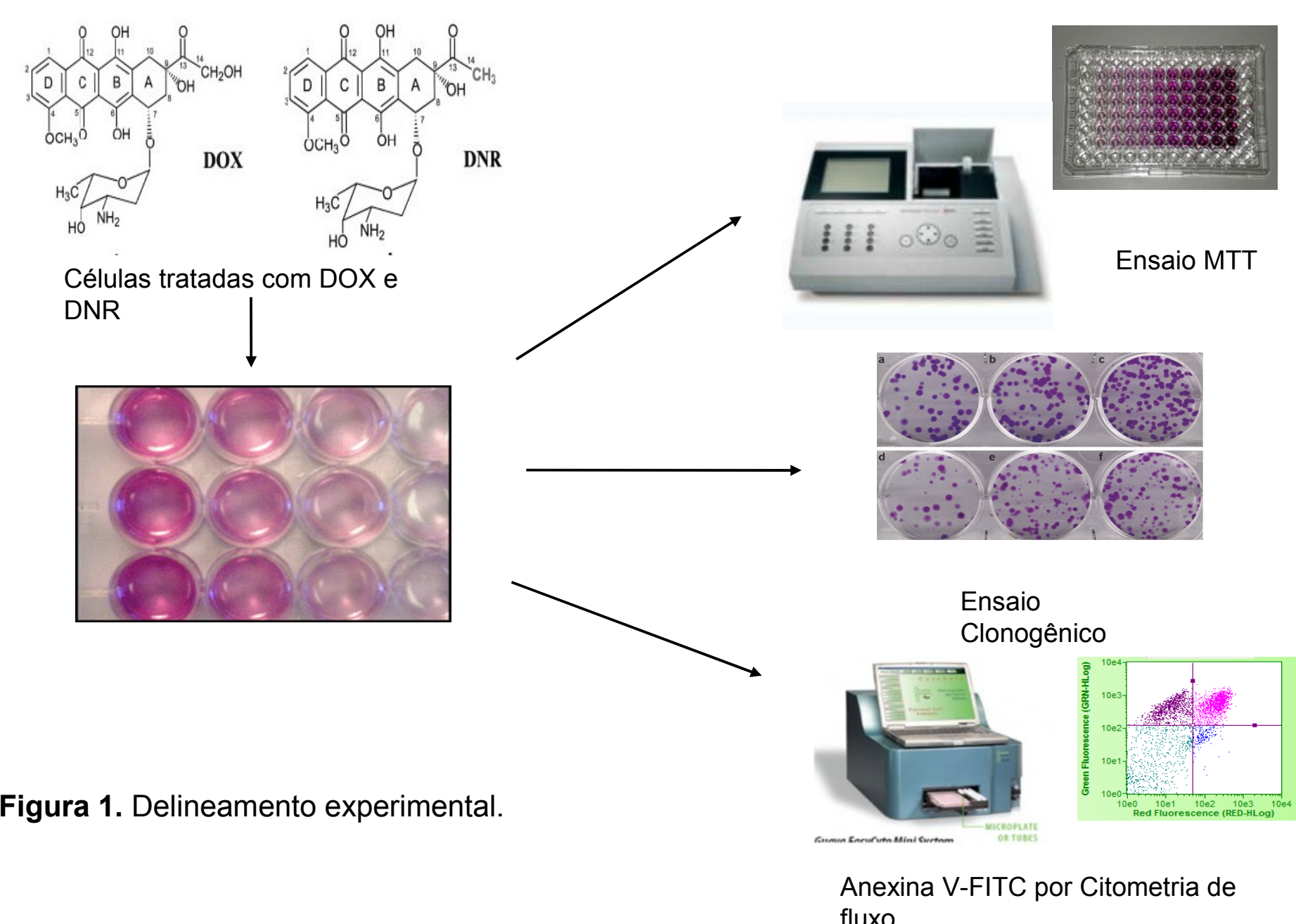


Figura 1. Delineamento experimental.

RESULTADOS

No ensaio de MTT (Figura 2), observou-se que as linhagens deficientes em NER (CSB, XPA e XPD) são mais sensíveis perante o tratamento de 72 horas com DOX (até 0,2 µg/mL) quando comparadas com a linhagem proficiente em NER (MRC5). No entanto perante o tratamento com DNR (até 0,2 µg/mL) as linhagens CSB e XPA, apresentam menor sensibilidade ao tratamento de 72 horas quando comparadas às linhagens MRC5 e XPD nas concentrações utilizadas. O ensaio de sobrevivência clonogênica (Figura 3) indica que todas as linhagens utilizadas apresentam maior sensibilidade aos tratamentos com DNR (0,005 µg/mL) comparados aos tratamentos com DOX (0,01 µg/mL). Observou-se indução de apoptose nas linhagens CSB, XPA e MRC5, de maneira dose-dependente, após tratamento por 72 horas com DNR e DOX. Surpreendentemente, a linhagem XPD apresenta a maior indução de apoptose na menor concentração utilizada de tratamento tanto para DNR quanto para DOX (Figura 4).

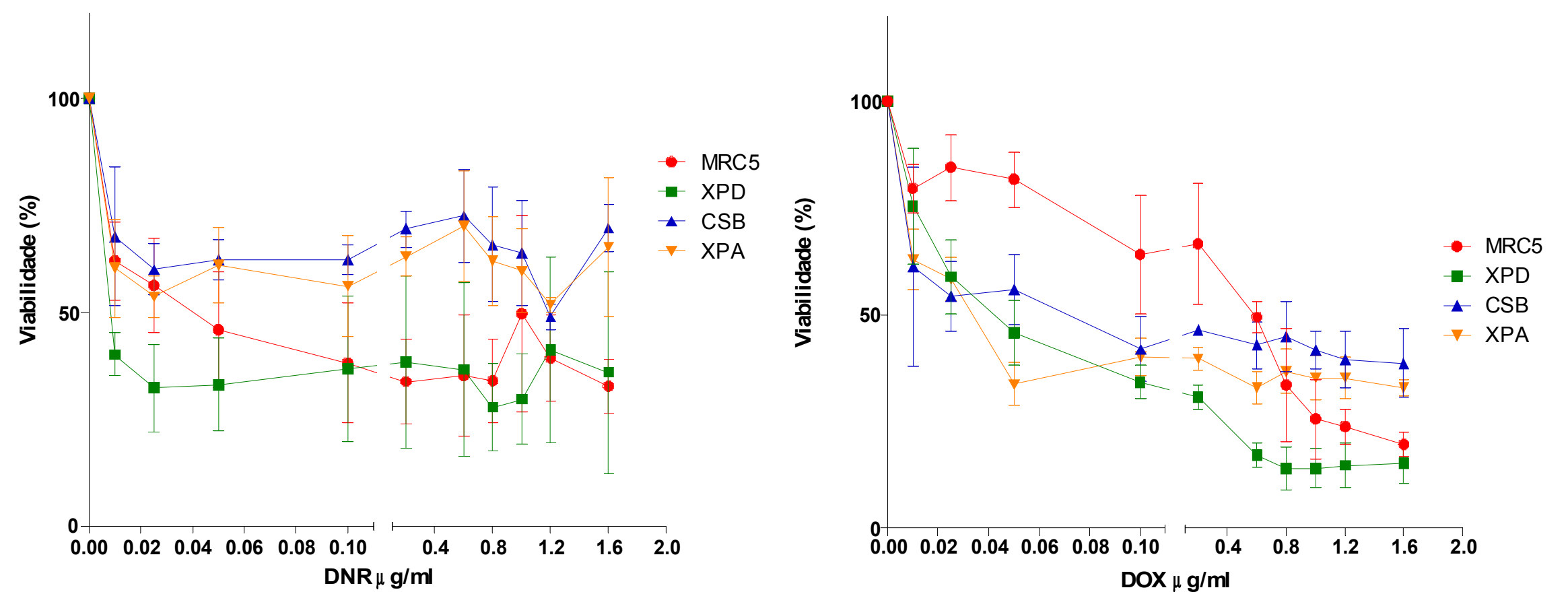


Figura 2. Sensibilidade das linhagens deficientes em NER (CSB, XPA, XPD) e da linhagem proficiente em NER (MRC5) às antraciclina. Células são expostas à DNR e DOX por 72 h e viabilidade celular é avaliada pelo ensaio MTT. Resultados são expressos como porcentagem do crescimento do controle para cada ponto e representa a média (± erro padrão) de três experimentos independentes.

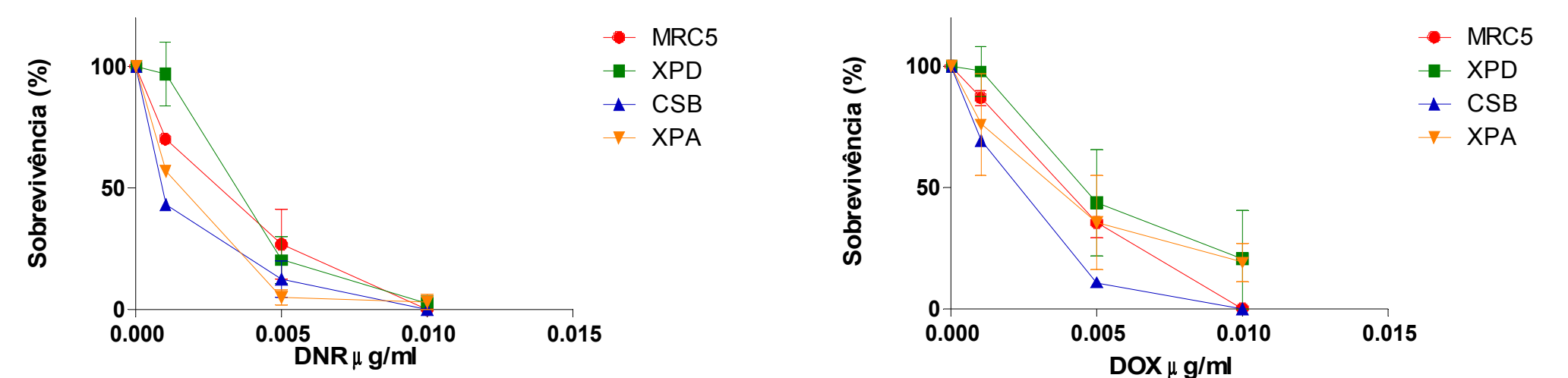


Figura 3. Ensaio de sobrevivência clonogênica. As células são plaqueadas 3.102 células /poço em placas de 6 poços e tratadas com 0,001;0,005; 0,01 µg/mL durante 72 h. Após 7 dias em meio livre de droga as células são fixadas e coradas com cristal violeta para determinar a formação de colônias. O percentual de colônias é calculado em relação ao controle não tratado.

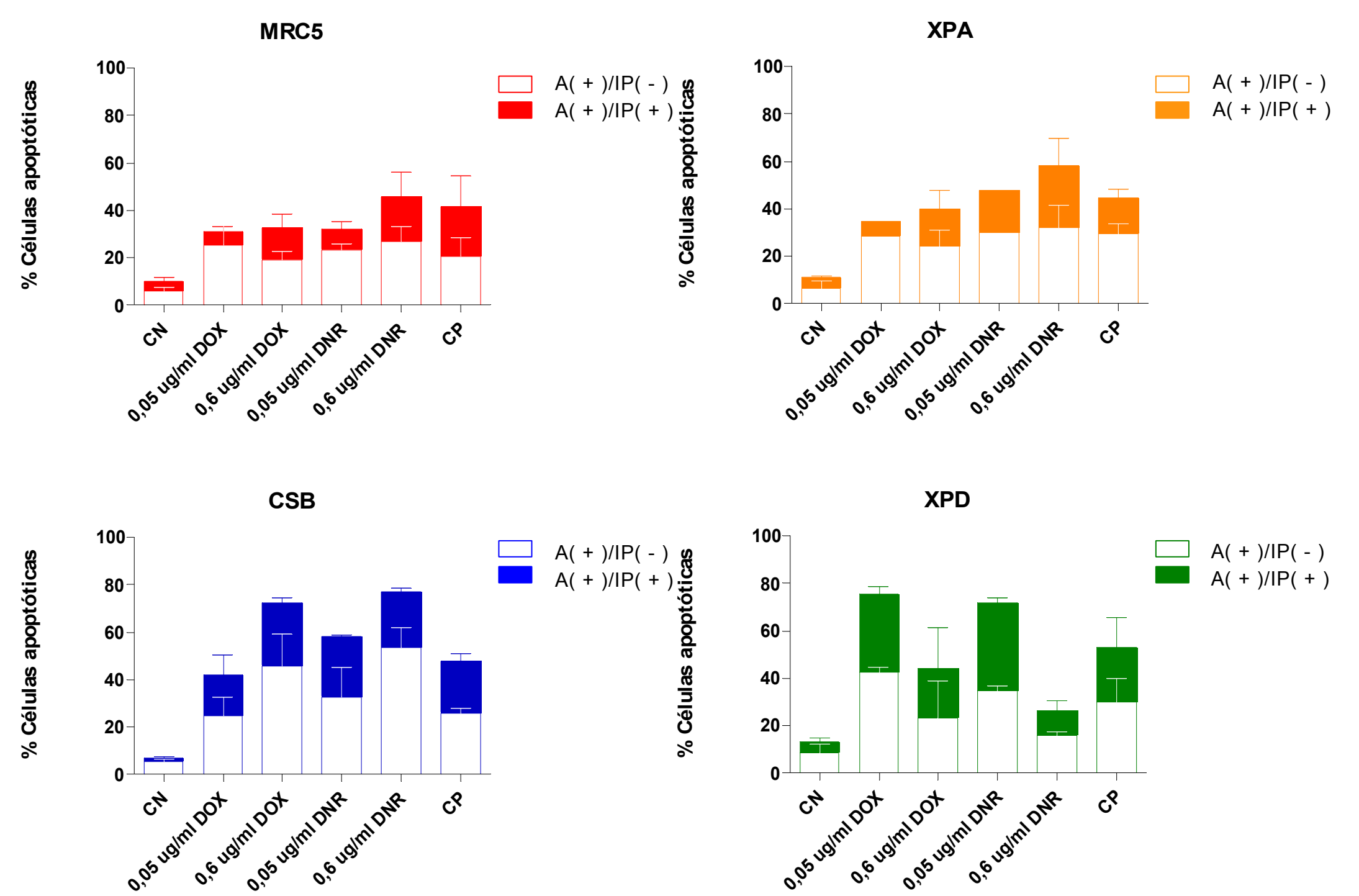


Figura 4. Anexina V – FITC por citometria de fluxo. Após tratamento de 72 h com 0,05 µg/mL e 0,6 µg/mL de DNR e DOX células são incubadas com Anexina V- FITC e Iodeto de Propídeo e analisadas por citometria de fluxo. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que as linhagens deficientes em NER, são mais sensíveis aos tratamentos com as antraciclina utilizadas, sugerindo que esse mecanismo de reparo possa estar relacionado ao processo de resistência ao tratamento com essas drogas. Apesar da alta sensibilidade da linhagem XPD aos tratamentos, a indução de apoptose nessa linhagem é menor que nas demais, o que sugere a presença de outro mecanismo de morte celular como necrose ou catástrofe mitótica.

Suporte financeiro: CAPES, FAPERGS e CNPq.