

Avaliar a contribuição do eixo NRF2/GCHI/BH4 na resistência à radioterapia do melanoma metastático

Vitor Knapick Mazzola¹, Jaqueline Pereira Moura Soares¹, Mara de Souza Junqueira², Fabiana Henriques Machado de Melo³

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas, Santa Casa de São Paulo Faculdade de Ciências Médicas, ² Instituto de Radiologia, Universidade de São Paulo, ³

Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Apoio financeiro: PIBIC

Introdução

O aumento da expectativa de vida da população, incremento de fatores de risco devido à vida urbana industrializada e a exposição à luz ultravioleta (UV) aumentaram muito as chances do desenvolvimento de diferentes cânceres. Enquanto que a falta de conhecimento sobre os diversos mecanismos do câncer, sua instabilidade genômica, potencial metastático e dificuldade de encontrar marcadores específicos pioraram o prognóstico e tornaram o tratamento difícil. Mais além, os tratamentos mais convencionais (radioterapia e quimioterapia) possuem diversos efeitos colaterais severos. Assim, o câncer é um dos maiores desafios encontrados hoje pela medicina e qualquer descoberta nessa área tem potencial de salvar milhares de vidas.

O melanoma é um dos cânceres de pior prognóstico e de incidência crescente, logo, entender seus mecanismos de resistência aos tratamentos atuais é essencial. O eixo NRF2/GCHI/BH4 tem papel importante na resistência ao estresse oxidativo causado pela radiação em melanócitos, porém não há informações quanto ao seu papel em melanomas. Assim, a premissa desse projeto foi averiguar a presença desse mecanismo nestes, além de suas implicações para a radioterapia.

Objetivos

- Avaliar a viabilidade das células submetidas à **radiação ionizante**
- Avaliar o potencial de formação de clones das células submetidas à **radiação ionizante**

Métodos

Cultura Celular

Nesse projeto foi utilizada a linhagem WM983 que corresponde ao melanoma de progressão metastática.

Ensaio de clonogenicidade

Após a irradiação, 200 células foram plaqueadas em cada poço e ficaram por 10 dias na estufa, passado esse tempo as células eram fixadas e coradas. Depois de 2 dias secando eram solubilizadas com SDS e então era lida no espectrofotômetro

Ensaio de viabilidade celular

A taxa de viabilidade foi estimada utilizando MTT. Após a irradiação a placa foi deixada por 24 horas na estufa e então era acrescentado o MTT. A absorbância foi medida com auxílio de espectrofotômetro.

Irradiação das células

As células foram divididas em dois grupos: o 1º com 4mM DAHP e 2º apenas com meio (Controle). A irradiação foi feita nas doses de 3 grays (Gy), 4,5 Gy ou 6 Gy, na presença ou ausência de DAHP.

Resultados

Capacidade clonogênica diminuída nas células tratadas com DAHP

Foi observada diminuição expressiva na capacidade de formação de clones de todas as células tratadas com o inibidor da GTPCH1, o DAHP. Dados do nosso grupo mostraram que a capacidade clonogênica da linhagem metastática Wm983 é diminuída na presença de DAHP mostrando a importância da BH4 na proliferação. Essa diferença é ainda mais proeminente nas células irradiadas com 4,5 e 6 Gy. (Figura 1c e 1e).

A viabilidade das células Wm983 irradiadas é menor na presença de DAHP

Nas células tratadas com DAHP houve um menor número de células viáveis após irradiação, este valor se tornou progressivamente maior com o aumento da radiação (Figura 2), assim, indicando uma relação direta entre a diminuição do sistema protetor GTPCH1/BH4 e os efeitos deletérios da radiação.

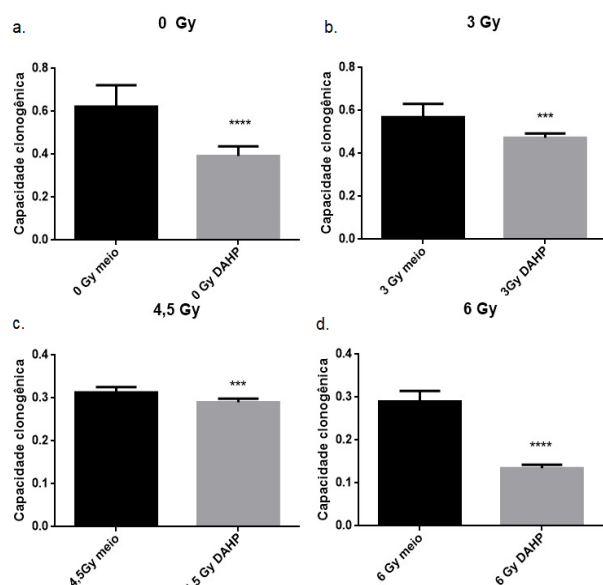


Figura 1 – A inibição da GTPCH1 nas células WM983 diminui sua capacidade clonogênica tanto na ausência de radiação (a), 3 Gy (b), 4,5 Gy (c) e em doses mais altas de maneira mais acentuada (d).

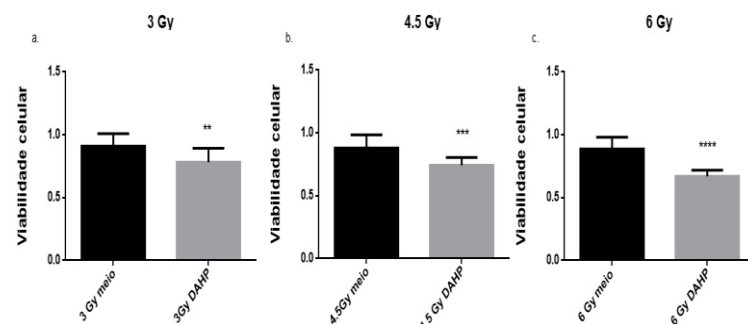


Figura 2 – A diminuição da viabilidade celular é estatisticamente diferente entre os grupos tratados e o controle, esse efeito parece ter relação direta com a dose de radiação dado que doses menores como 3 Gy tiveram um valor de p de 0,0036 (a), já a dose mais alta de 6 Gy obteve um $p < 0,0001$ (c). (b) A dose intermediária de 4,5 Gy teve um p de 0,0003.

Conclusão

Os resultados demonstram que o cofator tetrahydrobiopterina tem papel importante na proteção de células de melanoma metastático à radiação ionizante, já que o tratamento com DAHP, inibidor da enzima GTPCH1, enzima limitante na síntese *de novo* de BH4, diminui a viabilidade celular e a formação de clones. Esses dados abrem perspectivas para um novo tratamento combinado para o melanoma metastático.