



PAPEL DA PROTEÍNA COFILINA NA RESISTÊNCIA À CISPLATINA EM CÂNCER DE PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS

Marco Antônio De Bastiani¹; Matheus Becker Freitas¹; José Eduardo Vargas²; Leonardo Lisboa da Motta¹; José Cláudio Fonseca Moreira¹; Melissa Markoski³; e Fábio Klamt¹.

Departamento de Bioquímica (ICBS/UFRGS)¹
Departamento de Biofísica (IB/UFRGS)²
Instituto de Cardiologia³, Porto Alegre, Brasil



INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão de não-pequenas células (NSCLC) é o maior responsável por morte em decorrência de neoplasia maligna no mundo, sendo o tratamento com cisplatina o principal recurso terapêutico utilizado no tratamento desta patologia. A cofilina é uma proteína do citoesqueleto envolvida na dinâmica de actina, sendo um componente importante na motilidade celular. Em estudos anteriores, observamos que a quantidade de cofilina em linhagens de NSCLC correlaciona-se com a resistência a agentes alquilantes. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar o papel da cofilina na resistência à cisplatina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura celular: células de carcinoma de pulmão humano A549 foram cultivadas em meio RPMI-1640, com 10% de SFB, à 37°C e 5% CO₂.

IC50 da Cisplatina: o valor de IC50 foi determinado após 72h de tratamento (segundo protocolo NCI-60) pelo ensaio de sulforodamina B (SRB) e posteriormente analisado no programa GraphPadPrism.

Protocolo de Resistência Intrínseca: após a determinação do GI50, as células foram tratadas com 10 vezes seu IC50 de cisplatina por 24h. As células resistentes foram plaqueadas para nova análise de IC50 ou coletadas para Western Blot.

Western Blot: 25 µg de proteína foram utilizadas para a eletroforese em gel de poliacrilamida e as proteínas separadas foram posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, houve incubação com anticorpo policlonal de coelho para cofilina-1 (Abcam®) (1:2000) e secundário anticorpo (Dako®) (1:8000).

Super-expressão de Cofilina: 0,2 µg de plasmídeo de cofilina (pCMV-XL5) e Mock foram transfectados em placa de 96 poços utilizando lipofectamina na proporção 1:2 de plasmídeo:lipofectamina. A viabilidade celular foi posteriormente avaliada por ensaio de MTT.

DotBlot: 1, 2, 4 e 8 µl de amostras foram aplicadas a uma membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos como no Western Blot.

Análise Densitométrica: os valores de densitometria foram obtidos pelo programa Image J® e analisados no programa GraphPadPrism.

Estatística: para o IC50, foi utilizado teste t. Para o ensaio de viabilidade da transfecção e análise densitométrica, foi utilizado o teste ANOVA de uma via. Em ambas as análises, foi considerado significativo $p \leq 0,05$.

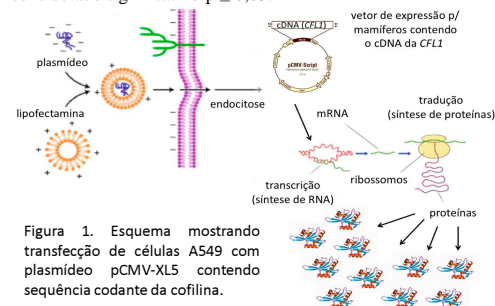
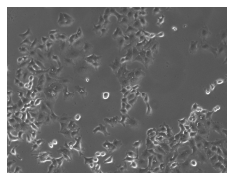


Figura 1. Esquema mostrando transfecção de células A549 com plasmídeo pCMV-XL5 contendo sequência codante da cofilina.

RESULTADOS

Células A549 Controle



Células A549 Resistentes

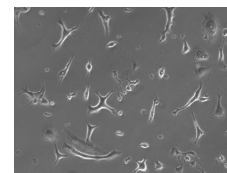


Figura 2. Figura mostra a mudança morfológica em células tratadas com 10 vezes o IC50 de cisplatina quando comparadas ao controle.

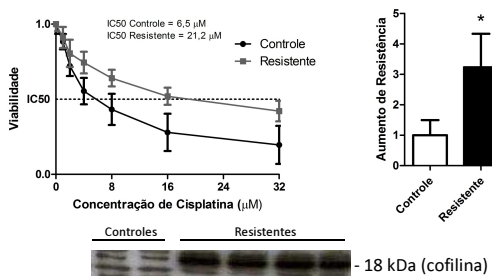


Figura 3. Valores de IC50 de células A549 após indução de resistência intrínseca, o aumento relativo da dose em relação ao controle e Western blot para cofilina de células A549 controle e resistente à cisplatina.

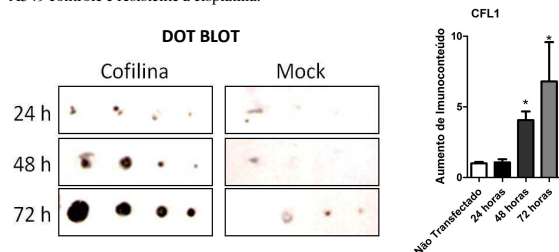


Figura 4. Análise densitométrica, em diferentes tempos, após a transfecção com o plasmídeo da cofilina (CFL1) e Mock.

DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores do grupo indicaram que a cofilina poderia estar envolvida na resistência a agentes alquilantes. Para investigar esse envolvimento, utilizamos um protocolo de resistência intrínseca e verificamos o imunoconteúdo das células selecionadas. O resultado obtido sugere que o imunoconteúdo de cofilina aumenta. A fim de reforçar o papel da cofilina na resistência à cisplatina, transfectamos células A549 com plasmídeo da cofilina. A super-expressão de cofilina e a viabilidade foram avaliadas em diferentes tempos. O próximo passo será a determinação do IC50 da cisplatina das células transfectadas. Até o momento, nossos resultados implicam que há envolvimento da cofilina na resistência à cisplatina.

Suporte:



MCT/CNPq Universal
(476114/2008-0)



INCT-TM
MCT/CNPq INCT-TM
(573671/2008-7)



CAPE S

