

INVESTIGAÇÃO DE CHK1 COMO POTENCIAL ALVO TERAPÊUTICO EM MELANOMAS RESISTENTES A INIBIDORES DE BRAF

Danielle G. Carvalho¹ (IC), Juliana C. Kenski², João P. B. Viola¹, Daniel S. Peeper² e Patricia A. Possik¹

¹ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; ² The Netherlands Cancer Institute

RESUMO

Introdução: O melanoma é um tipo de câncer de pele com alto potencial metastático e resistente às terapias convencionais. A maioria destes tumores apresenta a via de MAP Quinase constitutivamente ativa, o que permitiu o desenvolvimento de terapias alvo-específicas voltadas para a inibição desta via. O tratamento com inibidores de BRAF (iBRAF), proteína cujo gene é frequentemente mutado em melanomas, ou com a combinação de inibidores de BRAF e MEK, demonstram um importante aumento na sobrevida dos pacientes. Entretanto, a resistência terapêutica ainda representa um grande desafio clínico. Resultados preliminares do nosso grupo demonstram que células de melanoma resistentes aos iBRAF são mais sensíveis ao AZD7762, inibidor das quinases Chk1 e Chk2, quando comparadas com suas respectivas células parentais. Essas proteínas são essenciais no controle da progressão do ciclo e sinalização celular frente a danos ao DNA, orquestrando mecanismos de reparo ou, caso as lesões sejam irreparáveis, de morte programada. Atualmente, pouco se sabe sobre a participação da via de resposta a danos ao DNA na resistência aos iBRAF. Entretanto, devido à ausência de terapias eficientes para pacientes que desenvolvem resistência, o potencial da inibição de Chk1/2 como estratégia terapêutica merece um estudo mais aprofundado. Este trabalho pretende investigar o papel de Chk1 e seu potencial como alvo terapêutico no tratamento de melanomas resistentes aos iBRAF. **Metodologia:** Comparamos células parentais (A375) e resistentes (A375R) quanto à sensibilidade ao GDC0575, inibidor específico de Chk1. As células foram expostas a este inibidor e analisadas quanto à morte celular através da marcação de DNA fragmentado (Sub-G0) com Iodeto de Propídeo (PI). Para investigar as diferenças na progressão e controle do ciclo celular, as células parentais e resistentes foram sincronizadas na transição G1/S com duplo bloqueio de Timidina e analisadas através da marcação com PI e Bromodeoxiuridina (BrdU). Ambas as análises foram realizadas por citometria de fluxo. **Resultados e conclusões:** Nossos dados demonstram maior efeito citotóxico da inibição de Chk1 em células de melanoma resistentes quando comparadas a suas respectivas parentais. A análise de Sub-G0 comprovou que a diminuição da viabilidade é causada por morte celular, sendo mais intensa nas células resistentes. Observamos também que estas células apresentam alterações na progressão do ciclo celular, especialmente no controle do ponto de checagem G1/S. As diferenças observadas neste estudo podem guiar na busca pelos mecanismos responsáveis pela resistência terapêutica. Além disso, nossos resultados podem levar a potenciais benefícios clínicos, representando uma nova abordagem terapêutica em melanomas resistentes às terapias atuais.

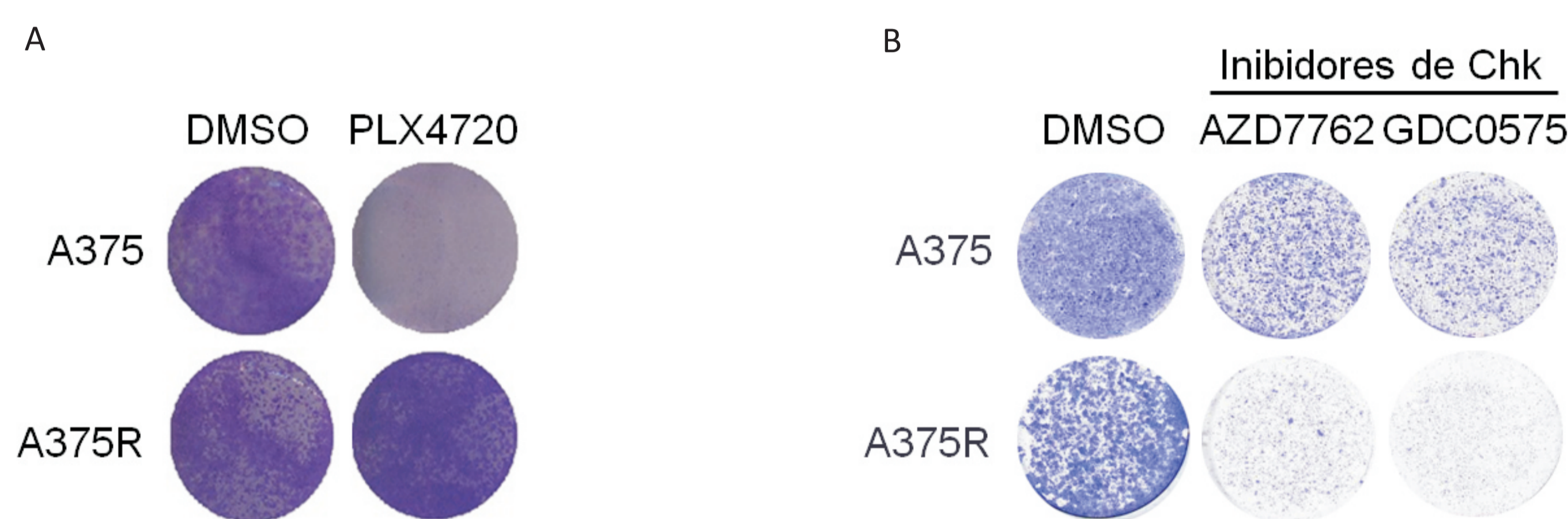


Figura 1. Células de melanoma resistentes a inibidores de BRAF são mais sensíveis à inibição de Chk. As linhagens A375 e A375 resistente (A375R) foram plaqueadas em mesmo número e incubadas com 1 μ M do inibidor de BRAF PLX4720 (A), com 0,3 μ M dos inibidores de Chk1/2 AZD7762 ou de Chk1 GDC0575 (B) por 6 dias, com reposição dos inibidores feita no terceiro dia. Como controle negativo foi utilizado o solvente (DMSO). As células foram coradas com solução de Cristal Violeta 0,1%.

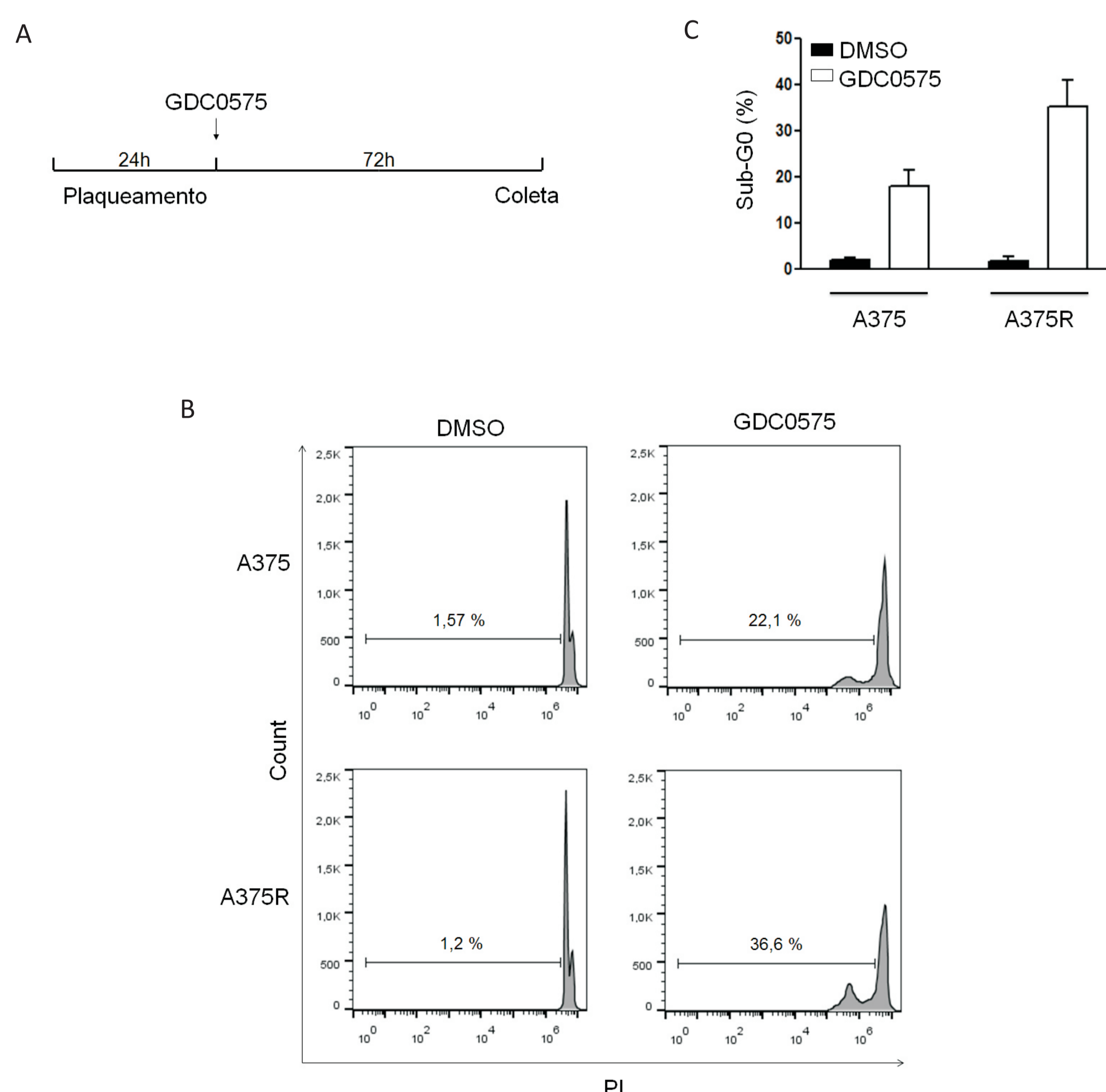


Figura 2. A morte causada pela inibição de Chk1 é mais severa em células resistentes a inibidores de BRAF. A) Representação esquemática do protocolo de análise de Sub-G0. As células A375 e A375R foram incubadas com 0,3 μ M do inibidor de Chk1 GDC0575 por 72 horas, fixadas com etanol 70% e marcadas com Iodeto de Propídeo (PI). Como controle negativo foi utilizado DMSO. B) Imagem representativa da análise de um dos experimentos. As frequências das populações em Sub-G0 estão representadas em cada histograma. Análise por Citometria de Fluxo (Accuri C6, BD). C) Média (+/- DP) da porcentagem de células em Sub-G0 após tratamento com GDC0575 (n=3).

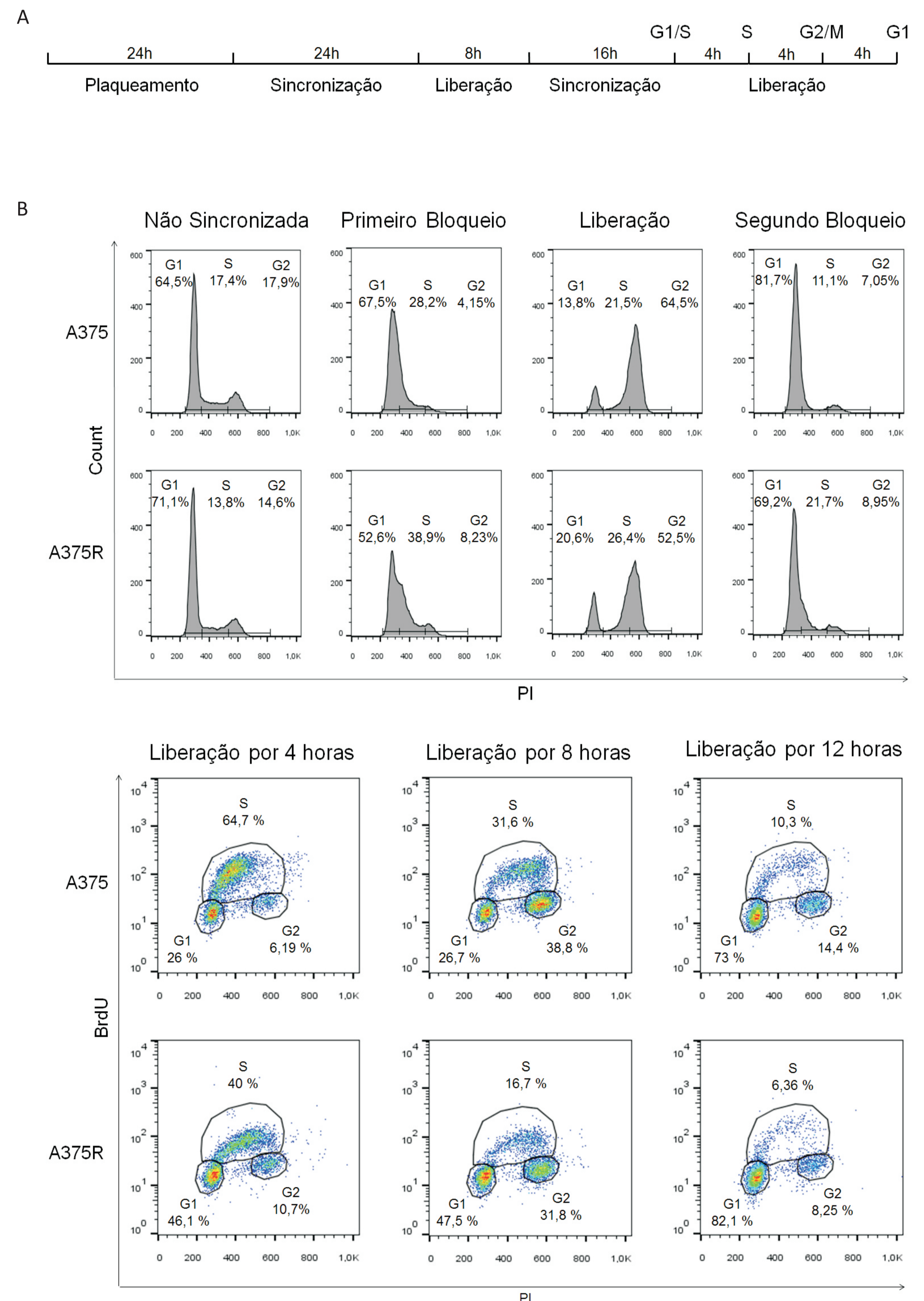


Figura 3. Células de melanoma resistentes a inibidores de BRAF escapam do bloqueio na transição G1/S. A) Representação esquemática do protocolo de Sincronização Celular. As células A375 (P) e A375R (R) foram incubadas com Timidina 2 mM por 24 horas, lavadas com PBS 1X, cultivadas em meio sem Timidina por 8 horas e novamente incubadas com Timidina por 16 horas. Anterior à coleta dos pontos, as células foram submetidas a um pulso com 10 μ M de Bromodesoxiuridina (BrdU) por 30 minutos para marcar células em replicação. As amostras foram fixadas com etanol 70% e marcadas com Iodeto de Propídeo (PI). B) Imagem da análise de um dos experimentos representando os pontos de execução do bloqueio e de 4, 8 e 12 horas após as 16 horas de incubação. As frequências de cada população nas fases G1, S e G2 estão representadas em cada histograma. Análise por Citometria de Fluxo (FACS Calibur, BD). C, D) Média (+/- DP) da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (n=3).

Agradecimentos e financiamento:

Gostaríamos de agradecer a Leonardo K. Teixeira, Luiza Primo e Karina Lani pelas discussões críticas e auxílio técnico. Este projeto e a bolsa de iniciação científica são financiados pelo programa Bolsista Jovem Talento (Ciência sem Fronteiras, CNPq).