

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DANILO GABRIEL DE OLIVEIRA

**Estabelecimento de linhagem celular de carcinoma pulmonar
resistente à Cisplatina: Impacto sobre heterogeneidade e
instabilidade cromossômica**

Alfenas – MG

2021

DANILO GABRIEL DE OLIVEIRA

Estabelecimento de linhagem celular de carcinoma pulmonar resistente à Cisplatina: Impacto sobre heterogeneidade e instabilidade cromossômica

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas a Saúde da Universidade Federal de Alfenas - Minas Gerais.

Área de concentração: Fisiopatologia

Orientador: Prof. Dr. Angel Mauricio Castro Gamero.

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Marisa Ionta

Alfenas – MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

O48e Oliveira, Danilo Gabriel de.
Estabelecimento de linhagem celular de carcinoma pulmonar resistente à Cisplatina: impacto sobre heterogeneidade e instabilidade cromossômica. / Danilo Gabriel de Oliveira. -- Alfenas/MG, 2021.
96f.: il. --
Orientador: Angel Maurício Castro Gamero
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Carcinoma Pulmonar de Células não Pequenas. 2. Diaminodicloroplatina. 3. Instabilidade Cromossômica. 4. Resistência a Medicamentos Antineoplásicos. I. Gamero, Angel Maurício Castro. II. Título.

CDD-571.9

DANILO GABRIEL DE OLIVEIRA

Estabelecimento de linhagem celular de carcinoma pulmonar resistente à Cisplatina: Impacto sobre heterogeneidade e instabilidade cromossômica

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia

Aprovada em: 24 e fevereiro de 2021

Prof. Dr. Angel Mauricio Castro Gamero

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL- MG

Prof. Dr. Marcos Vinicios Salles Dias

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL- MG

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Junior

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia - UFU



Documento assinado eletronicamente por Angel Mauricio Castro Gamero, Professor do Magistério Superior, em 24/02/2021, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Marcos Vinicios Salles Dias, Professor do Magistério Superior, em 24/02/2021, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Robson José de Oliveira Júnior, Usuário Externo, em 24/02/2021, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0468894 e o código CRC 1EA89F1D.

Para Daniel...

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) pela oportunidade oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento oferecido.

Ao Prof^o Dr. Angel Mauricio Castro Gamero, orientador, pelos conhecimentos transmitidos e pela paciência nos momentos de aperto.

À Prof^a. Dra Marisa Ionta, coorientadora, por todo o auxílio prestado durante a realização desse projeto.

À Prof^a Dra Pollyanna Francielly de Oliveira, por todo apoio dentro e fora do laboratório.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação pela política de incentivo à produção acadêmica.

À minha família por estar junto comigo em todos os momentos desde o início, durante todos os problemas, até o final. Um agradecimento especial à Maria do Carmo Reis, madrinha e tia e mãe, por nunca desistir de mim, por sempre me apoiar e por estar comigo até aqui. À Danielle Fernanda Cássia de Oliveira por ser uma irmã incrível e por servir de apoio nos momentos que mais precisei. À Maria de Fátima dos Reis Oliveira por ser uma mãe admirável e entender que os filhos precisam construir seus próprios caminhos. Há muitos nomes. Carrego todos com carinho especial no meu peito.

Aos amigos e colegas que entenderam que nem sempre é possível estar junto e, mesmo assim, é possível manter e fortalecer uma amizade.

Aos amigos de trabalho. Agradeço à Leilane Sales de Oliveira e ao Rafael Fernandes Martins por todo suporte, por todo apoio e por todos os momentos de risadas enquanto trabalhamos arduamente juntos. Vocês são incríveis.

À Mariane Minussi Baptistella, à Millena Giulia Gonçalves, à Caroline Sales de Oliveira, à Nathalia Neri de Souza, à Alécia Polo e à Raphaela Renata, companheiras de Ciência. Não preciso dizer o quão especial e necessárias

vocês foram para a realização desse trabalho. Tenho imensa alegria por ter vocês em minha vida.

À Leydy Alexandra Khayman, que mesmo longe, continuou fazendo parte de minha vida e de minha história.

A você, leitor, pois é por vocês que escrevemos trabalhos como esse.

“Nada na Biologia faz sentido exceto à luz da Evolução”.

- Theodosius Dobzhansky

RESUMO

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública e uma das principais causas de morte em todo o globo. Dentre os diferentes tipos de câncer, o câncer de pulmão representa o segundo tipo mais comum em homens e mulheres (sem contar o câncer de pele não melanoma) e, no Brasil, cerca de 13% de todos os casos novos de câncer. A quimioterapia continua sendo uma das principais estratégias de tratamento para tentar controlar o avanço da doença, tendo a cisplatina como seu quimioterápico principal. Porém, um grande desafio clínico é a quimiorresistência, a qual diminui significativamente as chances de sucesso terapêutico, sendo necessária a exploração de novas alternativas medicamentosas. Como o objetivo de entender este mecanismo tumoral, desenvolvemos linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar resistente à cisplatina utilizando estratégia *in vitro*, focando na análise dos mecanismos de instabilidade cromossômica (CIN) que poderiam contribuir para o fenótipo resistente. Após 3 tratamentos sequenciais na dosagem de 30 μ M com cisplatina, a linhagem resistente A549-R30, teve sua quimiorresistência confirmada por meio dos ensaios de viabilidade e capacidade clonogênica, além das mudanças morfológicas visíveis durante a manutenção das células em cultura. A linhagem A549-R30 também apresentou maior capacidade de migração por meio do ensaio de cicatrização de ferida nos tempos de 48h e 72h. De forma interessante, foi notado que a quantidade de biomarcadores de CIN presentes nas células A549-R30 foi menor que nas células parentais A549-P. Por fim, a avaliação citogenética corroborou a alta heterogeneidade tumoral das células A549-P, evidenciando maior número de alterações cromossômicas não clonais (NCCAs) quando comparada às células A549-R30 (12 vs 6 NCCAs, respectivamente). Após os ciclos de tratamento com cisplatina, o número cromossômico modal aumentou nas células resistentes A549-R30 e algumas populações cariotípicas da linhagem parental foram selecionadas. Tudo isso nos sugere que o processo de quimiorresistência está intimamente ligada ao nível de CIN, bem como aos mecanismos de manutenção dessa instabilidade e, conseqüentemente, o desenvolvimento de um processo de seleção e evolução

cariotípica, os quais determinam perfis genômicos vantajosos para a célula tumoral resistente.

Palavras-chave: Carcinoma pulmonar de células não pequenas; Cisplatina; Instabilidade Cromossômica; Quimiorresistência;

ABSTRACT

Cancer is one of the biggest public health problems and a major cause of death worldwide. Among the different types of cancer, lung cancer represents the second most common type of cancer in men and women (not counting non-melanoma skin cancer) and, in Brazil, it represents about 13% of all new cancer cases. Chemotherapy remains one of the main treatment methods to try to control the progress of the disease, with cisplatin as its main chemotherapeutic agent. However, a major clinical challenge is chemoresistance, which reduces the chances of therapeutic success, allowing the exploration of new drug alternatives. In order to understand this tumor mechanism, developers of cisplatin-resistant lung adenocarcinoma cell line, using in vitro analysis, focusing on analyses of chromosomal instability mechanisms (CIN) that could contribute to the resistant phenotype. After 3 sequential treatments at the dosage of 30 μ M with cisplatin, the resistant strain A549-R30 had its chemoresistance confirmed through viability and clonogenic capacity tests, in addition to the visible morphological changes during the maintenance of cells in culture. The cell line A549-R30 also showed greater migration capacity through the wound healing assay in the 48h and 72h times. Interestingly, it was noted that the amount of NIC biomarkers present in A549-R30 cells was the lowest in the parental cell A549-P. Finally, a cytogenetic evaluation corroborates a high tumor heterogeneity of A549-P cells and a greater number of non-clonal chromosomal alterations (NCCAs) when compared to A549-R30 cells (12 vs 6 NCCAs, respectively); and showed that, after the cisplatin treatment cycles, the modal chromosomal number increased in the resistant cells A549-R30 and some karyotypic alterations of the parental lineage were selected. All of this suggests that the chemoresistance process is closely linked to the level of CIN, as well as the mechanisms for maintaining this instability and, consequently, the development of a process of selection and karyotype evolution, which determine advantageous genomic profiles for the resistant tumor cell.

Passwords: Small cell lung cancer; Cisplatin, Chromosomal instability; Chemoresistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vias de atuação da cisplatina mostrando os módulos nuclear e citoplásmico.....	24
Figura 2 - Esquema de tratamento feito com 30µM de cisplatina.....	37
Figura 3 - A linhagem resistente (A549-R30) apresenta diferenças morfológicas em relação à linhagem parental.....	44
Figura 4 - Valor de IC ₅₀ na linhagem resistente comparada à linhagem parental foi maior após 3 ciclos de tratamento.....	47
Figura 5 - Número de células das linhagens A549-P e A549-R30.....	50
Figura 6 - Tempo de dobramento das duas linhagens analisadas.....	51
Figura 7 - Representação da capacidade clonogênica de ambas as linhagens (A549-P e A549-R30).....	52
Figura 8 - Ensaio de clonogenicidade comparando o crescimento relativo de colônias para as linhagens A549-P e A549-R30.....	53
Figura 9 - Ensaio de cicatrização de feridas mostrando a capacidade de migração das linhagens.....	55
Figura 10 - Fotomicrografias de células representativas do ensaio de micronúcleo.....	58
Figura 11 - Índice de Divisão Nuclear.....	59
Figura 12 - Frequência de biomarcadores de instabilidade cromossômica encontradas em ambas as linhagens avaliadas.....	60
Figura 13 - Quantidade de células contendo micronúcleos.....	61
Figura 14 - Quantidade e células contendo brotos.....	63
Figura 15 - Quantidade de células contendo micronúcleo + broto.....	64
Figura 16 - Comparação do total de células com anormalidades entre as linhagens A549-P e A549-R30 para cada um dos tratamentos	67

Figura 17 - Cariótipos representativos das linhagens A549-P e A549-R30.....	70
Figura 18 - Perfil cariotípico da linhagem A549-P.....	71
Figura 19 - Perfil cariotípico da linhagem A549-R30.....	72
Figura 20 - Número de cromossomos distribuídos por metáfases para linhagem parental e resistente.....	74
Figura 21 - Mudança na frequência e distribuição de CCAs e NCCAs entre a linhagem parental e a resistente.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de Biomarcadores de instabilidade encontrados em cada tratamento, em cada uma das linhagens.....	65
Tabela 2 - Diferença Cariotípica entre as linhagens A549-P e A549-R30.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B	Broto
BRCA1	Do inglês, <i>Breast cancer 1</i>
BID	Agonista de Morte de Domínio de Interação com BH3 (do inglês, BH3-interacting domain death agonist)
CCA	Alterações cromossômicas clonais (do inglês, <i>clonal chromosomal alterations</i>)
CDK	Cinase dependente de ciclina 1
CIN	Instabilidade cromossômica (do inglês, <i>chromosomal instability</i>)
C-Myc	Do inglês, <i>cellular Myelocytomatosis</i>
CPCNP	Carcinoma pulmonar de células não pequenas
CPCP	Carcinoma pulmonar de células pequenas
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal do tipo 2 (do inglês, <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)
HIC-1	Proteína hipermetilada em câncer do tipo 1
HPV	Papilomavírus Humano (do inglês, Human papillomavirus)
IC ₅₀	Concentração inibitório média
ICBP90	Do inglês, <i>inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa</i>
IDN	Índice de Divisão Nuclear
M4N	Ácido tetra-o-metil nordihidroguaiarético
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama que recebe esse nome por ser o acrônimo de Michigan Cancer Foundation-7
MN	Micronúcleo
NCCA	Alterações cromossômicas não-clonais (do inglês, <i>non-clonal chromosomal alterations</i>)
NF-1	Neurofibromatose do tipo 1

NSCLC	Non small cell lung cancer
P	Ponte
P21	Gene que codifica a proteína inibidora de CDK1
RM	Ressonância magnética
SCLC	Small cell lung cancer
TOPO2A	DNA-topoisomerase 2 ^a
TP53	Gene que codifica uma proteína citoplasmática de massa molecular de 53 kda
TSLC1/IGSF4	Molécula de Adesão Celular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Câncer.....	17
2.2	Câncer de Pulmão.....	19
2.3	Cisplatina.....	22
2.4	Quimiorresistência.....	25
2.5	Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT) e Câncer.....	28
2.6	Heterogeneidade Tumoral e Instabilidade Cromossômica.....	29
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	Objetivo Geral.....	34
4.2	Objetivos Específicos.....	34
5	METODOLOGIA	35
5.1	Linhagens celulares e condições de cultura.....	35
5.2	Desenvolvimento de linhagem resistente.....	35
5.3	Ensaio de Viabilidade por Resazurina.....	38
5.4	Ensaio de <i>Doubling Time</i>	38
5.5	Ensaio Clonogênico.....	38
5.6	Ensaio de Migração.....	39
5.7	Ensaio de Micronúcleo.....	40
5.8	Ensaio de Citogenética.....	42
5.9	Análise estatística.....	42
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1	A linhagem A549-R30 apresenta mudança de morfologia.....	43
6.2	A linhagem A549-R30 apresenta maior IC ₅₀	47
6.3	A linhagem resistente apresenta o mesmo <i>Doubling Time</i> que a célula parental.....	49
6.4	O ensaio clonogênico.....	52
6.5	A linhagem resistente apresenta maior capacidade de migração.....	54
6.6	A linhagem resistente apresenta maior número de biomarcadores de instabilidade.....	57

6.7	O perfil citogenético da linhagem resistente apresenta-se mais homogêneo em relação ao perfil da linhagem parental.....	68
7	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICES	93

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, o câncer de pulmão é um sério problema de saúde pública no mundo todo. Dados de GLOBOCAN (2020) mostram que o número de novos casos anuais é de aproximadamente 2,2 milhões, já as mortes chegam a 1,79 milhões de indivíduos todo ano (SUNG *et al.*, 2021). De acordo com sua histologia, o câncer de pulmão é dividido em dois grandes grupos: carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP) e carcinoma pulmonar de células pequenas (CPCNP), sendo o primeiro grupo responsável por quase 86% dos diagnósticos (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2018).

O tratamento para o câncer de pulmão se dá por meio de cirurgia nos estágios iniciais e, mesmo assim, a média de sobrevivência de 5 anos é menor que 70%, já que a recorrência da doença é comum após a ressecção cirúrgica. Nos estágios avançados da doença uma abordagem multidisciplinar de tratamento é geralmente usada, consistindo-se de 4 ciclos de quimioterapia baseada em cisplatina com adição de algum agente citotóxico ou citostático de terceira geração - anti-EGFR (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*) e anti-VEGFR (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), por exemplo, (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de uma linhagem resistente a um determinado tratamento pode ajudar na busca pelo entendimento acerca dos mecanismos envolvidos no processo de resistência adquirida, tão presente na clínica. O microambiente tumoral, somado à pressão exercida pelo quimioterápico de interesse, faz com que células com perfis citogenéticos mais vantajosos sejam selecionadas, lançando, assim, luz sobre a evolução tumoral.

Aqui, células de CPCNP foram expostas à cisplatina. Após 3 ciclos de tratamento com valores correspondentes ao IC₅₀ da droga a morfologia celular, bem como a capacidade clonogênica, a instabilidade cromossômica (CIN) e o perfil cariotípico das linhagens parental e resistente foram avaliados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

O organismo humano funciona tal como uma sociedade, na qual seus integrantes, as células, se organizam para formar tecidos, órgãos e sistemas. As alterações moleculares que, de alguma forma, desestabilizam essa harmonia representam uma série de problemas para a sociedade multicelular, uma vez que uma mutação pode, por exemplo, dar vantagem a uma célula, de forma que ela cresça e se divida mais rapidamente e sobreviva mais facilmente que suas vizinhas (ALBERTS *et al.*, 2017).

Resultado de falhas nos mecanismos de controle do crescimento e proliferação celular, o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo uma das principais causas de morte tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento (TORRE *et al.*, 2012; LODISH *et al.*, 2014; SIEGEL *et al.*, 2017).

Na guerra contra o câncer, os tecidos normais podem ser entendidos como aqueles cuja biologia, fisiologia, desenvolvimento e bioquímica podem ser facilmente descritos. O inimigo, obviamente, são as células cancerosas que evoluem continuamente devido a mutações e eventos de seleção natural em nível celular, histológico e/ou sistêmico (WU, 2016).

O desenvolvimento da instabilidade genômica, que leva a aquisição contínua de defeitos genéticos durante o crescimento tumoral, está relacionado à heterogeneidade genética intratumoral, que tem sido encontrada na maioria dos cânceres. A identificação de mutações subclonais e de evolução paralela mostram fortes evidências de que a heterogeneidade tumoral pode ser entendida sob à luz da seleção Darwiniana. Essa natureza evolutiva do câncer é apontada como a responsável pela aquisição de novos fenótipos relevantes para a progressão tumoral, tais como a habilidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes ou de se metastatizar (VON LOGA e GERLINGER, 2017).

Por esse ângulo, as células normais adquirem, paulatinamente, diversas alterações cromossômicas e gênicas que estão associadas ao perfil maligno da doença. Tais mudanças, garantem, desse modo, que células normais se tornem, de fato, células cancerosas e essas passam, portanto, a competirem com as

células não transformadas em busca de sobrevivência (SPENCER *et al.*, 2006; HANAHAN e WEINBERG, 2011). O câncer é caracterizado, então, como um complexo de alterações em diversas escalas, sendo um conjunto de diversas doenças causadas pelas alterações de vias e processos biológicos responsáveis por sustentar a proliferação acelerada das células (DU e ELEMENTO, 2014; INCA, 2016).

Proposta por Hanahan e Weinberg (2000) - e atualizada mais tarde pelos mesmos autores, em 2011 - uma série de características mostram como uma célula normal poderia dar origem a uma célula transformada. Em suma, as marcas registradas do câncer (do inglês, *hallmarks of cancer*) fornecem uma importante estrutura unificadora para estudos dos fatores moleculares dos tumores. Essas marcas definem um conjunto de fenótipos celulares e bioquímicos comuns compartilhados por tumores de diferentes tecidos de origem, articulando princípios fundamentais da tumorigênese e formando a base para avanços recentes na terapia do câncer (TRIGOS *et al.*, 2018).

A saber, essas características, ou marcas do câncer, podem ser descritas como: manutenção do sinal proliferativo, evasão dos supressores de crescimento, grande capacidade de invasão e metástase, imortalidade, indução de angiogênese, resistência à morte celular, capacidade de evitar a morte mediada pelo sistema imune, inflamação, instabilidade genômica e mutação e metabolismo energético celular desregulado (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

As mudanças genômicas apresentadas pelas células transformadas têm diversas origens, uma vez que vários são os fatores que podem desencadear o câncer. Dentre eles, se destacam o uso de tabaco e de álcool, a falta de atividade física e algumas infecções crônicas como aquelas causadas pela *Helicobacter pylori*, *Human papillomavirus* (HPV), *Hepatitis B virus*, *Hepatitis C virus* e *Epstein-Barr virus* (PLUMMER, *et al.*, 2016).

Por outro lado, o dano ao DNA ocorre continuamente no organismo humano (e de outros seres vivos) via fatores endógenos e exógenos, e parece desempenhar um papel crucial em vários tipos de processos biológicos, estando relacionado também à origem do câncer, como mostra a Figura 1 (BASU, 2018).

Muitas evidências têm demonstrado, ainda, que o câncer está associado com eventos de duplicação do genoma, que está relacionado com aumento da instabilidade cromossômica (CIN) e aneuploidia. Esse processo se torna ainda

mais evidente com a perda da função do supressor tumoral TP53 e favorece a progressão tumoral levando a um diagnóstico ruim (SALMINA *et al.*, 2019).

2.2 Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é um problema de saúde mundial, sendo a causa mais comum de mortes relacionadas a câncer nos Estados Unidos e em todo o globo (WU E RAZ, 2016). No Brasil, é o segundo mais comum em homens e mulheres (sem contar o câncer de pele não melanoma) e cerca de 13% de todos os casos novos de câncer são de pulmão. É notável que a taxa de incidência vem diminuindo desde meados da década de 1980 e meados dos anos 2000, entre homens e mulheres, respectivamente, diferença essa que se deve aos padrões de adesão e cessação do tabagismo constatados nos diferentes sexos (INCA, 2019).

Geralmente, os sintomas não aparecem até que o câncer esteja avançado, mas algumas pessoas com câncer de pulmão em estágio inicial podem apresentar tosse persistente, escarro com sangue, dor no peito, rouquidão, piora da falta de ar, perda de peso e de apetite, pneumonia recorrente ou bronquite, além de cansaço ou fraqueza. Já nos fumantes, o ritmo habitual da tosse é alterado e aparecem crises em horários incomuns. A detecção da doença pode ser feita por meio da investigação com exames clínicos, laboratoriais ou radiológicos em pessoas com sinais e sintomas sugestivos da doença (diagnóstico precoce), ou com o uso de exames periódicos em pessoas sem sinais ou sintomas (rastreamento), mas pertencentes a grupos com maior chance de ter a doença (INCA, 2019).

O câncer de pulmão é o tipo mais comum de câncer, apresentando um prognóstico ruim para o paciente, que reflete em uma taxa de sobrevivência de 5 anos em torno de 18%. O principal fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer é, sem dúvida, o tabagismo, por meio do qual a exposição contínua aos carcinógenos da fumaça do tabaco é capaz de induzir uma alta taxa de mutação nas células do pulmão. Assim, a acumulação de mutações em diferentes oncogenes e supressores de tumor levam à causa de tumorigênese para quase todos os tipos de câncer de pulmão. Desse modo, dentro do amplo grupo de câncer de pulmão, uma ampla diversidade morfológica e aberrações

genéticas são observadas, indicando que esta é uma doença heterogênea (SEMENOVA *et al.* 2015).

Os principais fatores de risco para o câncer de pulmão são o uso de cigarros, ser fumante passivo, dieta desregulada (com excesso de enlatados, embutidos, frituras e pimenta), ingestão de álcool, a falta de exercícios ou atividades físicas rotineiras, poluição do ar, exposição ocupacional e suscetibilidade gênica. Vale ressaltar que o surgimento ou não do câncer de pulmão – assim como de outros tipos de cânceres - varia de indivíduo para indivíduo, podendo ser uma junção de vários desses fatores (MOLINA *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, os cânceres de pulmão são classificados em carcinoma pulmonar de células pequenas (CPCP, do inglês: *small cell lung cancer - SCLC*) e de células não-pequenas (CPCNP, do inglês: *non-small cell lung cancer - NSCLC*). Os CPCPs são tumores malignos que compreendem aproximadamente 15% dos cânceres pulmonares e podem ser identificados por suas características neuroendócrinas. Já os CPCNP representam 80-85% de todos os cânceres de pulmão e incluem outros tipos de tumores que não sejam CPCPs. Tais distinções refletem a histopatologia da doença, bem como o decurso dela, e se relacionam às opções terapêuticas encontradas para tratar um tipo ou outro (RELLI *et al.*, 2019).

Como mencionado, o CPCNP consiste no tipo mais prevalente e pode ser classificado em três subtipos. O primeiro deles é o adenocarcinoma, responsável por 40% dos casos, geralmente encontrado em pacientes com hábito de fumar e, curiosamente, é prevalente em pacientes tabagistas passivos. Outro subtipo é o carcinoma de células escamosas, responsável por 30% dos diagnósticos. Esse subtipo está ligado à região dos brônquios, geralmente o perfil do paciente também é fumante, possuindo uma estreita relação com inflamação crônica. Por último, o terceiro subtipo encontrado é o carcinoma de células grandes, com diagnósticos em torno de 15-20%, com tendência a gerar metástases precocemente, dificultando, assim, o tratamento. Menos frequentemente, podem ocorrer também outros tipos, tais como carcinoma adenoescamoso e carcinoma sarcomatoide (CHEN *et al.*, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; RELI *et al.*, 2019).

Geneticamente, mais do 60% dos casos de CPCNP caracterizam-se pela hiperexpressão do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico com atividade tirosina quinase (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), gene este localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p11.2). Ademais, dos pacientes portadores da hiperexpressão desse gene, observou-se que, apesar de a maioria responder bem no início do tratamento, uma grande porcentagem tem adquirido resistência à terapia dentro de um ano. A maior causa dessa resistência tem sido em decorrência de uma mutação no éxon 20 do gene *EGFR*, o que, por sua vez, ocorre em 50% dos casos (SANTOS; SHEPHERD; TSAO, 2011; ZHU, 2018).

Outra alteração genética, frequentemente relacionada, não só em 35-55% dos CPCNP, bem como em outras várias malignidades incluindo câncer de mama e carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, é a mutação no gene *TP53*. A proteína p53 é um supressor de tumor, codificado pelo gene *TP53*, o qual corresponde ao gene mais frequentemente mutado em cânceres humanos dos mais diversos tipos. No que tange o câncer de pulmão, sua frequência é maior entre o subtipo carcinoma de células escamosas. Além disso, a maioria dos estudos clínicos sugerem uma relação direta entre esta mutação e um efeito prognóstico negativo, acompanhado de uma menor sobrevida daqueles em processo quimioterápico (LABBÉ *et al.*, 2017).

De forma interessante, mutações apresentam-se de maneira simultânea em ambos os genes (*TP53/EGFR*) em 41% dos pacientes como demonstrado por Labbé e colaboradores (2017). Ademais, descobriu-se que nesses pacientes, a coexistência das mutações não teve influência no tempo de sobrevida livre de recidiva ou na sobrevida global após ressecção cirúrgica primária. Desse modo, apesar de, isoladamente, serem consideradas biomarcadores de mau prognóstico, quando em conjunto essa co-mutação não é um forte marcador prognóstico em pacientes não tratados. Por esses motivos, muitos outros mecanismos que influenciam diretamente no decorrer da doença, especialmente no processo de progressão tumoral, têm ainda que serem mais bem caracterizados (ZHU *et al.*, 2017).

Dentre os tratamentos, a quimioterapia é um pilar de longa data no tratamento de CPCNP, uma vez que a maioria dos diagnósticos ocorrem em estágios avançados da doença. Mais de 30% dos casos de CPCNP são

diagnosticados como doença em estágio IV. Além disso, uma proporção substancial de casos em estágio inicial desenvolverá recorrência metastática dentro de 5 anos após o diagnóstico inicial, sendo 24% daqueles no estágio I e 84% daqueles em estágio III (GOODGAME *et al.*, 2009).

Os principais objetivos da quimioterapia no estágio avançado ou metastático de CPCNP são a melhoria da sobrevida e a atenuação dos sintomas. A quimioterapia à base de platina continua sendo a espinha dorsal do tratamento na maioria dos casos, sendo que a cisplatina foi associada a uma melhora modesta na sobrevida (YUAN *et al.*, 2019). Um estudo separado identificou o uso de cisplatina como um preditor independente de melhores resultados com uma razão de chances de sobrevida de 0,44 a favor da quimioterapia, e com um aumento na sobrevida global mediana de 3,9 para 6,7 meses (DIETRICH e GERBER, 2016).

Diversos esforços científicos têm sido realizados para entender a biologia do CPCNP e, conseqüentemente, encontrar melhores opções terapêuticas para este tumor. Em 1973, Giard e colaboradores desenvolveram uma série de linhagens celulares derivada de tumores sólidos humanos, dentre elas a linhagem de CPNCP, chamada, então, A549. A linhagem foi coletada de um paciente do sexo masculino, com 58 anos na data da ressecção cirúrgica. Os autores verificaram ainda, durante análise dos cromossomos, que a linhagem estabelecida possuía número modal de 66 cromossomos, com ao menos 3 cromossomos marcadores. Desde seu estabelecimento, devido a suas boas características na cultura, a linhagem é um modelo de pesquisa atrativo para o estudo do metabolismo e mecanismo de diferentes substâncias anti-CPCNP (GAO *et al.*, 2017). Ao se pesquisar por “A549 cell line” é possível verificar que, no último triênio, por exemplo (2017, 2018 e 2019) foram publicados mais de 5000 trabalhos no PubMed, utilizando essa linhagem, que apresenta o gene TP53 do tipo selvagem (PUBMED, 2020).

2.3 Cisplatina

Sintetizado por M. Peyrone, em 1844, o cis-diamminodicloroplatina (II) foi aprovado pela primeira vez pela FDA (Food and Drug Administration) em 1978 para o tratamento de câncer de testículo e bexiga. Mais conhecido como

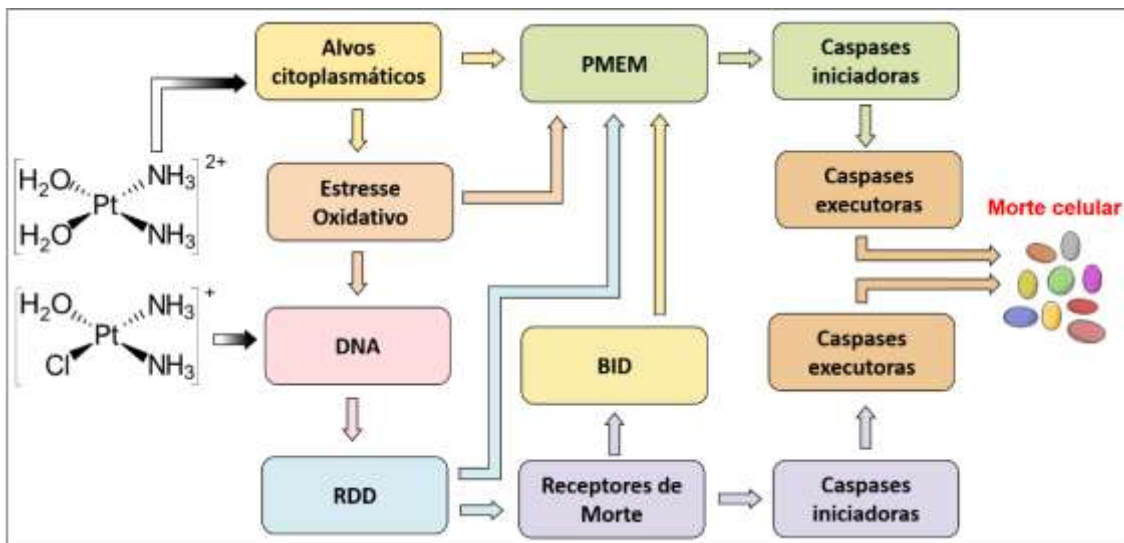
cisplatina (ou CDDP), ele é um composto à base de platina amplamente empregado na clínica, que exerce atividade clínica contra uma ampla variedade de tumores sólidos, incluindo câncer testicular, bexiga, ovário, colorretal, cabeça e pescoço e pulmão (GALLUZZI *et al.*, 2012; DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

A cisplatina é um composto à base de platina, com geometria planar quadrada. Ela é um pó geralmente branco em temperatura ambiente, levemente solúvel em água e é solúvel em dimetilprimanida e N,N-dimetilformamida. Sob temperaturas e pressões normais, a cisplatina é estável, mas pode se transformar, no decorrer do tempo, em um trans-isômero (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

Os efeitos anticâncer da cisplatina ocorrem por meio de uma via de sinalização entrelaçada, que pode ser separada em um módulo nuclear e um módulo citoplasmático (Figura 1). Como tal, a cisplatina é inerte e deve ser ativada intracelularmente por uma série de reações de hidrólise, que consistem na substituição de um ou de ambos os grupos cis-cloro por moléculas de água. Esta reação ocorre espontaneamente no citoplasma e leva à geração das formas altamente reativas mono e bi-hidratadas da cisplatina (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Assim, a cisplatina, na forma bi-hidratada, age sobre alvos citoplasmáticos, causando estresse oxidativo, levando à permeabilização da membrana externa da mitocôndria, o que leva à ativação de caspases iniciadoras, caspases executoras e, por fim, à morte celular. Por outra via, a cisplatina, mono-hidratada, age diretamente sobre o DNA ativando as vias de resposta ao dano de DNA, que ativa receptores de morte, que levam à ativação de proteínas BID (do inglês, *BH3-interacting domain death agonist*), que atua no citoplasma e leva também à permeabilização da membrana externa da mitocôndria e consequente ativação da cascata de apoptose. Por outro lado, os receptores de morte podem agir diretamente sobre caspases iniciadoras e também levar à morte celular (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Figura 1: Vias de atuação da cisplatina mostrando os módulos nuclear e citoplasmático.



Fonte: GALLUZZI *et al.*, 2012. Adaptado.

Nota: DNA: Ácido Desoxirribonucleico; RDD: Resposta ao Dano de DNA; BID: do inglês, BH3-interacting domain death agonist. PMEM: permeabilização da membrana externa da mitocôndria.

A forma mono-hidratada é reconhecida como uma espécie altamente reativa, mas sua formação possui uma taxa limitante na interação com muitos nucleófilos endógenos, como glutatona (GSH), metionina, metalotioneína e proteína. Assim, quando a cisplatina entra nas células, é potencialmente vulnerável à inativação citoplasmática por esses e outros componentes intracelulares (SIDDIK, 2003).

Há muito tempo os mecanismos bioquímicos envolvidos na entrada da cisplatina na célula estão sob investigação. Por muito tempo, a difusão passiva foi considerada o principal modo pelo qual a cisplatina atravessa a membrana celular, mas hoje já se sabe que a difusão ativa possui relevante importância, por meio da participação de transportadores de cobre e transportadores catiônicos orgânicos (TCO) (NEVES; VARGAS, 2011).

Desse modo, após a entrada na célula, a citotoxicidade da cisplatina é principalmente atribuída à sua interação com os sítios N7 nucleofílicos das bases de purina no DNA. Isso leva à geração dos complexos DNA-proteínas, bem como dos adutos inter e intra-fitas. No entanto, as evidências favorecem fortemente os adutos intra-fitas, pois as lesões são amplamente responsáveis pela ação citotóxica. Isso é consistente com o conhecimento de que as ligações cruzadas ApG e GpG 1,2-intrafitas são as principais formas de adutos de DNA, representando 85-90% do total de lesões (SIDDIK, 2003; GALLUZZI *et al.*, 2012)

A formação dos adutos com a cisplatina provoca distorções significativas na dupla hélice do DNA, causando desenovelamento e torção da sua estrutura, que, por sua vez, são responsáveis pela indução de apoptose e necrose (NEVES; VARGAS, 2011).

A cisplatina frequentemente leva a um sucesso terapêutico inicial associado com respostas parciais ou estabilização da doença. No entanto, muitos pacientes ainda (em especial, mas não somente, aqueles com câncer de pulmão) são intrinsecamente resistentes aos tratamentos baseados em cisplatina. Ademais, uma importante fração dos tumores sensíveis ao tratamento eventualmente desenvolvem quimiorresistência. O nível exato de resistência à cisplatina em pacientes é de difícil definição, mas é possível inferir, a partir de estudos clínicos, que a dose padrão clínica de cisplatina é duplicada em alguns protocolos de terapia intensiva, podendo chegar a um aumento de 50-100x em outros casos (SIDDIK, 2003; GALLUZZI *et al.*, 2012).

2.4 Quimiorresistência

Diante o exposto, o que se entende como câncer tem mudado nos últimos anos, permitindo um rápido avanço nas pesquisas em oncologia. A doença por si só não é somente caracterizada como uma massa de crescimento incontrolável e excessivo de células anormais, mas também é definida pelas alterações dinâmicas no genoma dessas células, o que leva à formação do tumor (ABDULLAH; CHOW, 2013).

Sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo e, nos últimos anos, alvo de inúmeros avanços significativos no campo do tratamento da doença, ainda hoje nenhum método é totalmente eficaz contra o câncer, sendo a resistência aos quimioterápicos uma das principais causas de falhas no tratamento (ZARGAR *et al.*, 2020).

Vários fatores estão relacionados à falha no tratamento anticâncer. As substâncias podem ser administradas sistemicamente e, assim, estão sujeitas a variações na absorção, no metabolismo e na distribuição aos tecidos alvos, variando de paciente para paciente. Além disso, os tumores podem estar localizados em partes do corpo nos quais as substâncias não conseguem penetrar tão facilmente, ou ainda podem estar protegidos pelo microambiente

local devido ao aumento da pressão hidrostática ou até mesmo pela vascularização alterada do tumor (SZAKÁCS *et al.*, 2006).

O tratamento quimioterápico representa um importante aspecto do tratamento da doença. Entretanto, é cada vez mais evidente que o desenvolvimento de resistência à terapia influencia sobremaneira na recidiva tumoral e nos prognósticos negativos do paciente (CANINO; CIOCE, 2016).

A quimiorresistência é um fenômeno bem conhecido que surge quando a doença se torna tolerante ao tratamento farmacêutico. Esse conceito foi pela primeira vez elaborado quando se notou que as bactérias se tornavam resistentes a certos antibióticos. Desde então, o conceito de quimiorresistência passou a estar associado também a outras doenças, incluindo o câncer, já que mecanismos similares foram observados nas células de pacientes que recebiam algum tipo de quimioterapia (HOUSMAN *et al.*, 2014).

Diante desse panorama, apesar do desenvolvimento de quimioterápicos potentes contra os mais diversos tipos de tumores, um tratamento realmente eficaz - que traga uma cura duradoura para a maioria dos pacientes - ainda está fora de alcance. Isso se deve, em partes, ao desenvolvimento de resistência à substância utilizada no tratamento, que ocorre devido a um comportamento adaptativo notável das células cancerosas e que são decorrentes de fatores genéticos e epigenéticos (SENTHEBANE *et al.*, 2017).

Alguns métodos de resistência às drogas são específicos da espécie, enquanto outros, tais como o efluxo de drogas, que é observado tanto em microrganismos como em células cancerosas humanas resistentes, são conservados evolutivamente (HOUSMAN *et al.*, 2014).

A resistência aos quimioterápicos pode, assim, ser classificada em dois tipos. Ao desenvolvimento de resistência durante o decurso do tratamento dá-se o nome de resistência adquirida. Por meio dela, tumores que não eram inicialmente resistentes a um tratamento específico acabam, frequentemente de maneira rápida, se tornando resistentes. Isso acontece principalmente devido a seleção e decorrente crescimento de variantes celulares na massa tumoral, que são resistentes à droga, resultando na ineficiência do tratamento (ALLEN; WEISS, 2010). Enquanto isso, a resistência intrínseca diz respeito à habilidade inata das células tumorais de se manterem viáveis em sua primeira exposição ao tratamento (CORNELISON *et al.*, 2017).

Historicamente, os primeiros estudos que se depararam com resistência adquirida à terapia foram testes clínicos em 1965 em neoplasia pediátrica hematopoiética. Nesses testes, usando uma combinação de vários agentes citotóxicos, foi observado o primeiro progresso real na tentativa de aumentar a taxa de sobrevivência das crianças com leucemia. No entanto, esse sucesso foi interrompido por recorrências nas quais as células leucêmicas adquiriram a capacidade de resistir ao tratamento, protegendo pela barreira hematoencefálica. Os agentes terapêuticos usados então foram incapazes de passar eficientemente pela barreira hematoencefálica, levando os pacientes a sucumbirem diante a doença resistente a multidrogas. Esse fato mostrou a primeira evidência clara de que os cânceres podem se aproveitar das próprias defesas do organismo para resistir ao tratamento (CORNELISON *et al.*, 2017).

A abundância de mudanças fenotípicas que aparecem em células humanas resistentes à cisplatina, por exemplo, já está bem documentada. Tais mudanças incluem resistência cruzada a muitos compostos estruturalmente relacionados, diminuição do acúmulo de platina nessas células em associação com o declínio dos níveis de adutos DNA-platina, mudanças na expressão de genes envolvidos na maioria dos aspectos de sobrevivência celular (incluindo genes de apoptose), gene de reparo de dano de DNA, chaperonas, transportadores, genes do ciclo celular e vários outros. Além disso, uma das características mais proeminentes da resistência celular à cisplatina é o acúmulo reduzido do composto. Como consequência da captação ou retenção reduzida, a formação de adutos de DNA de platina é diminuída, reduzindo a citotoxicidade, resultando em mais resistência ao composto de platina (DING-WU *et al.*, 2012; HAIYAN *et al.*, 2016).

Os alvos das substâncias antitumorais incluem timidilato sintase, replicação de DNA, topoisomerases I e II e tubulina. Já os mecanismos de resistência incluem mutações pontuais, deleções, rearranjos genéticos e ampliações. A CIN (amplificações, deleções e outros rearranjos) é também uma característica comum dos tumores em geral e está associada à heterogeneidade tumoral e, conseqüentemente, à resistência aos tratamentos (HUGHES; ANDERSSON, 2015).

Como apontado por Yakisich e seus colaboradores, em 2017, grande parte das falhas dos tratamentos de câncer de pulmão é devida a alta

heterogeneidade intratumoral, que é responsável pela presença de células dentro da massa tumoral com sensibilidades diferentes aos quimioterápicos.

Diversos estudos têm buscado esclarecer os mecanismos de geração da quimiorresistência em diferentes tipos de tumores, obtendo informações que permitam contornar a quimiorresistência, seja pelo desenvolvimento racional de novas substâncias, seja por meio de novos modos das substâncias serem direcionadas até o local de ação, seja pela combinação de outros compostos conhecidos, ou ainda, por meio de outros tratamentos que busquem aumentar a atividade antineoplásica e reverter o processo de resistência (MOSCOW *et al.*, 2017). Para isso, o desenvolvimento *in vitro* de linhagens resistentes torna-se importante e possui sua relevância residida no fato de que essas novas linhagens permitem o entendimento dos porquês envolvidos na aquisição de resistência.

2.5 Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT) e Câncer

A quimiorresistência surge a partir de uma série de mecanismos relacionados ao efluxo de droga, ao metabolismo dos fármacos utilizados no tratamento e às mutações presentes nos alvos moleculares das drogas, por exemplo. Mais recentemente, diversos estudos têm voltado sua atenção à transição epitélio-mesenquimal (do inglês EMT, epithelial-mesenchymal transition) devido ao seu papel na quimiorresistência tumoral (DU e SHIM, 2016).

A EMT foi originalmente descrita como um mecanismo para formar células mesenquimais primárias na mesoderme de tecidos epiteliais primitivos durante a gastrulação nos primeiros estágios da embriogênese. Com o decorrer do tempo o conceito foi expandido para explicar alterações fenotípicas em linhagens epiteliais de tecidos adultos, que resultava, dentre outras características, na perda de adesão célula-célula e no ganho de perfil mesenquimal incluindo aumento da mobilidade e rearranjo do citoesqueleto, ganhando assim a capacidade de migrar individualmente e invadir membranas basais e paredes dos vasos sanguíneos/linfáticos, quando sobrevivem na corrente sanguínea como células tumorais circulantes e, finalmente, extravasam para órgãos distantes (YAN *et al.*, 2010; SAITOH, 2018).

No início dos anos 1990, a ligação entre a EMT e a resistência às drogas foi sugerida. Na ocasião, foi descoberto que linhagens celulares de MCF-7 resistentes à adriamicina apresentavam perfil de EMT, com um aumento significativo na expressão de vimentina e redução de desmossomos e junções oclusivas, características essas ligadas ao perfil de transição epitélio-mesenquimal. Uma vez que nem todas as células de MCF-7 da população resistente apresentavam fenótipo EMT, foi constatado que na população cancerosa heterogênea, as células EMT têm vantagem seletiva na presença de drogas. Isso sugere um papel importante da EMT na quimiorresistência tumoral (DU; SHIM, 2016).

É importante ressaltar que as metástases, ao invés dos tumores primários, são responsáveis pela mortalidade associada ao câncer humano. A invasão de células cancerosas, durante a disseminação metastática, pode empregar vários processos de migração. Dentre elas, a migração de células cancerosas individuais. Nesse caso, a migração de uma única célula cancerosa, também conhecida como migração mesenquimal, é caracterizada por morfologia semelhante a fibroblastos e depende de interações celulares mediadas por integrinas e matriz extracelular e está intimamente ligada ao ganho de fenótipo EMT e, conseqüentemente, a uma maior malignidade (SAITOH, 2018).

2.6 Heterogeneidade Tumoral e Instabilidade Cromossômica

Manter um genoma estável é uma tarefa essencial, complexa e vital para todo organismo vivo. Em um primeiro momento, a ideia de se manter o genoma estável parece ser mais promissora para o indivíduo, contudo, isso não permitiria qualquer mudança evolutiva. Torna-se necessário, portanto, um certo nível de instabilidade genômica. Dito isso, fica evidente que o genoma deve ser estável o suficiente para permitir o funcionamento adequado e a reprodução fiel de um organismo e, ao mesmo tempo, permitir a ocorrência de alterações evolutivas (BOHLANDER; KAKADIA, 2015).

A estabilidade genômica é, por conseguinte, o resultado de um balanço fino entre o dano de DNA e seu reparo. Esse é um aspecto não só importante para a manutenção da espécie, mas também porque o nível de estabilidade genômica está associado a tumores e tem grande influência no potencial

“evolutivo” do câncer e, conseqüentemente, na sua habilidade de se adaptar a diferentes mudanças externas, tais como a quimioterapia (YATES; CAMPBELL, 2012; BOHLANDER; KAKADIA, 2015).

Há mais de 100 anos, Theodor Boveri propunha, pela primeira vez, o conceito de CIN em células tumorais. Segundo ele, e após evidências experimentais suportadas pelas ideias propostas por Gregor Mendel, os cânceres são oriundos de instabilidade genômica e decorrentes da expansão clonal de células transformadas, isto é, a massa tumoral se origina de uma única célula que se divide formando clones (HANSFORD; HUNTSMAN, 2014).

A instabilidade genômica é uma característica marcante nos cânceres humanos e resultam em aberrações genéticas em vários níveis: desde a troca de um único nucleotídeo no nível do gene, até a perda ou ganho de cromossomos inteiros. A instabilidade cromossômica, chamada de CIN (do inglês, *chromosomal instability*) é uma forma de instabilidade genômica observada em uma ampla variedade de tumores, incluindo câncer de pulmão. A CIN pode ser definida como uma série de alterações espaço-temporais na estrutura e no número de cromossomos. Ela descreve, então, um dinamismo presente nas células transformadas, pelo qual essas células continuamente ganham ou perdem cromossomos inteiros – ou partes deles – e, portanto, é um mediador importante de aneuploidia e heterogeneidade tumoral, sendo responsável pela adaptação aos desafios presentes no microambiente no qual o tumor está inserido (NEGRINI *et al.*, 2010; McGRANAHAN *et al.*, 2012; GRONROOS; LÓPEZ-GARCÍA, 2018).

CIN e aneuploidia são distintas, mas intimamente relacionadas e têm sido demonstradas como influenciadoras da carcinogênese e da resposta terapêutica. Vale ressaltar que a aneuploidia é uma das mais comuns alterações cromossômicas, caracterizada por um número não balanceado de cromossomos, podendo ser consequência de uma CIN. Em cânceres humanos, isso é exemplificado pela hiperploideia da leucemia linfoblástica aguda e pelo quase-triploide neuroblastoma, que tem um cariótipo aneuploide estável e um prognóstico favorável (McGRANAHAN *et al.*, 2012; BACH *et al.*, 2019).

Em geral, as células cancerosas apresentam os dois tipos de CIN: numérica e estrutural. A CIN numérica (nCIN – do inglês, *numerical chromosome instability*) diz respeito à perda e ao ganho de cromossomos inteiros. Já a CIN

estrutural (sCIN – do inglês, *structural chromosome instability*) refere-se ao aumento na taxa de formação de cromossomos estruturalmente anormais (McGRANAHAN *et al.*, 2012; BACH *et al.*, 2019). Esses processos levam então à formação de genomas exageradamente alterados com a presença, dentre outras alterações, de fragmentação cromossômica e figuras mitóticas defeituosas. Em suma, essas alterações elevam e potencializam a instabilidade, dando início ao processo de tumorigênese (HENG *et al.*, 2013; DENISENKOVA *et al.*, 2016; RANGEL *et al.*, 2017).

Estudos citogenéticos realizados em linhagens de câncer de pulmão identificaram CPCNP com cariótipo mais complexo ao ser comparado com linhagens CPCP (GRIGOROVA *et al.*, 2005). No CPCNP, foi sugerido que o subtipo de células escamosas apresenta maior frequência de características associadas ao fenótipo de CIN ao ser comparado com o subtipo de adenocarcinoma (LUK *et al.*, 2001). A aquisição de CIN no câncer de pulmão foi descrita como fator de aumento de sua malignidade. Contudo, mais estudos sobre o papel preciso da CIN na iniciação e progressão tumoral do câncer de pulmão são necessários (MASUDA; TAKAHASHI, 2002).

Para facilitar o processo de análise do fenótipo cariotípico, costuma-se dividir as alterações em dois grandes grupos: alterações cromossômicas clonais (CCA, do inglês: *clonal chromosomal abnormalities*) e não clonais (NCCA, do inglês: *non-clonal chromosomal abnormalities*) (CASTRO-GAMERO *et al.*, 2013). As CCAs são aquelas aberrações cromossômicas encontradas pelo menos duas vezes dentro de 20 figuras mitóticas examinadas. Enquanto isso, as NCCAs possuem frequência inferior a 4% entre 50-100 figuras mitóticas. Essas últimas indicam o nível de heterogeneidade tumoral (RANGEL *et al.*, 2017). Assim como Stepanenko *et al.* (2016) e o Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenômica Humana (ISCN, do inglês: International System for Human Cytogenomic Nomenclature, 2016), foram consideradas como clonais aquelas alterações presentes em pelo menos duas células e não clonais (NCCAs) aquelas que apareceram em somente uma célula.

Uma vez que a CIN leva à tumorigênese e resulta na heterogeneidade observada nos tumores, essa última também se torna alvo de interesse de estudos. Em 2017, por exemplo, Jamal-Hanjani e sua equipe coletaram amostras de 100 pacientes que apresentavam CPCNP e que não tinham

recebido nenhum tipo de tratamento prévio. Para os autores, a diversidade genética dentro de um tumor pode agir como um substrato para que ocorra uma seleção natural no microambiente tumoral e, assim, ela contribui para que o tumor evolua. Com base nisso, após avaliar as amostras coletadas, os autores puderam verificar que havia uma extensa heterogeneidade tumoral, com uma média de 30% de mutações somáticas do tipo subclonais, enquanto as alterações no número de cópias (também classificadas como subclonais) chegavam a 48%. Esses dados sugerem que a instabilidade genômica vista em níveis mutacionais e cromossômicos estão presentes durante o desenvolvimento do tumor.

3 JUSTIFICATIVA

Mesmo com os inúmeros avanços no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de cânceres, a resistência aos quimioterápicos é ainda um grande empecilho no que tange à cura e bom prognóstico de pacientes com esta doença.

O desenvolvimento *in vitro* de linhagens resistentes a compostos de interesse auxilia na compreensão do surgimento da resistência na clínica. Dessa forma, ajuda a apontar, avaliar e compreender os mecanismos citogenéticos e celulares envolvidos na obtenção da resistência, lançando luz sobre os meios que podem ser utilizados para superar tal resistência, de tal modo a tornar o tratamento novamente eficaz.

Assim, aumentar o nosso entendimento acerca do papel da instabilidade cromossômica como um modulador do desenvolvimento tumoral e de quimiorresistência é crucial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estabelecer linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas resistentes à cisplatina e avaliar a influência da resistência adquirida sobre a heterogeneidade e instabilidade cromossômica.

4.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos desse trabalho:

- a) Desenvolver células de adenocarcinoma pulmonar resistentes à cisplatina por meio do tratamento sequencial a dose constante;
- b) Comprovar a aquisição de resistência farmacológica por meio de ensaios de quimiossensibilidade e capacidade proliferativa;
- c) Verificar a capacidade de formação de colônias da linhagem resistente, frente a sua linhagem parental;
- d) Avaliar a capacidade de migração de ambas as linhagens por meio do ensaio de cicatrização de feridas;
- e) Avaliar os possíveis danos citogenéticos em ambas as linhagens (parental e resistente) por meio do ensaio de micronúcleo;
- f) Investigar as mudanças no perfil citogenético da linhagem resistente comparada à linhagem parental.

5 METODOLOGIA

5.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura

A linhagem humana de câncer de pulmão de células não pequenas (A549) utilizada nesse estudo foi obtida do banco de linhagens celulares do Rio de Janeiro (BCRJ) (Rio de Janeiro, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Foram mantidas em garrafa de cultura de 25cm² contendo meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino). Após confluência, de maneira a se manter e expandir as linhagens, as células foram enzimaticamente desprendidas das garrafas com tripsina a 0,05% (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA) e a suspensão celular foi imediatamente dividida em novas garrafas de cultura. Todas as culturas celulares foram mantidas e todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Genética Humana da Unifal-MG. Antes dos experimentos, foi realizada a respectiva autenticação genética da linhagem celular no Laboratório de Genética Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), examinando os loci polimórficos CSF1PO, D13S317, D16S539, D5S818, D7S820, THO1, TPOX, e vWA para perfis de repetição em tandem curto (STR) sob a supervisão do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, tendo homologia para o 100% dos loci, confirmando assim a sua identidade genética.

5.2 Desenvolvimento de Linhagem Resistente

A linhagem A549 foi caracterizada e utilizada em trabalhos anteriores do Laboratório de Genética Humana da Unifal – MG. Diante dos resultados promissores encontrados nesses trabalhos, foi decidido avaliar-se, então, as mudanças fenotípicas e citogenéticas de linhagens resistentes à cisplatina. Para isso, foi utilizado o método baseado naquele descrito por Barr e colaboradores (2013).

Nesse método, as células, ao atingir a confluência de 80-90% na garrafa de 25cm², foram expostas a ciclos consecutivos de exposição a cisplatina na concentração de 30µM por 72 horas. A definição de tal dosagem foi baseada em

valores próximos de IC_{50} ($27,71\mu M \pm 3,10$), obtidos em trabalhos prévios da equipe do Laboratório de Genética Humana da Unifal-MG. Por esse motivo, as linhagens resultantes obtidas por este tratamento de dose constante receberam os nomes de A549-R30. Após 72h de exposição à droga, o meio de cultura foi trocado e as células cresceram então em meio livre da droga. Foram mantidas em cultura duas garrafas que receberam o tratamento e duas garrafas que não receberam o tratamento.

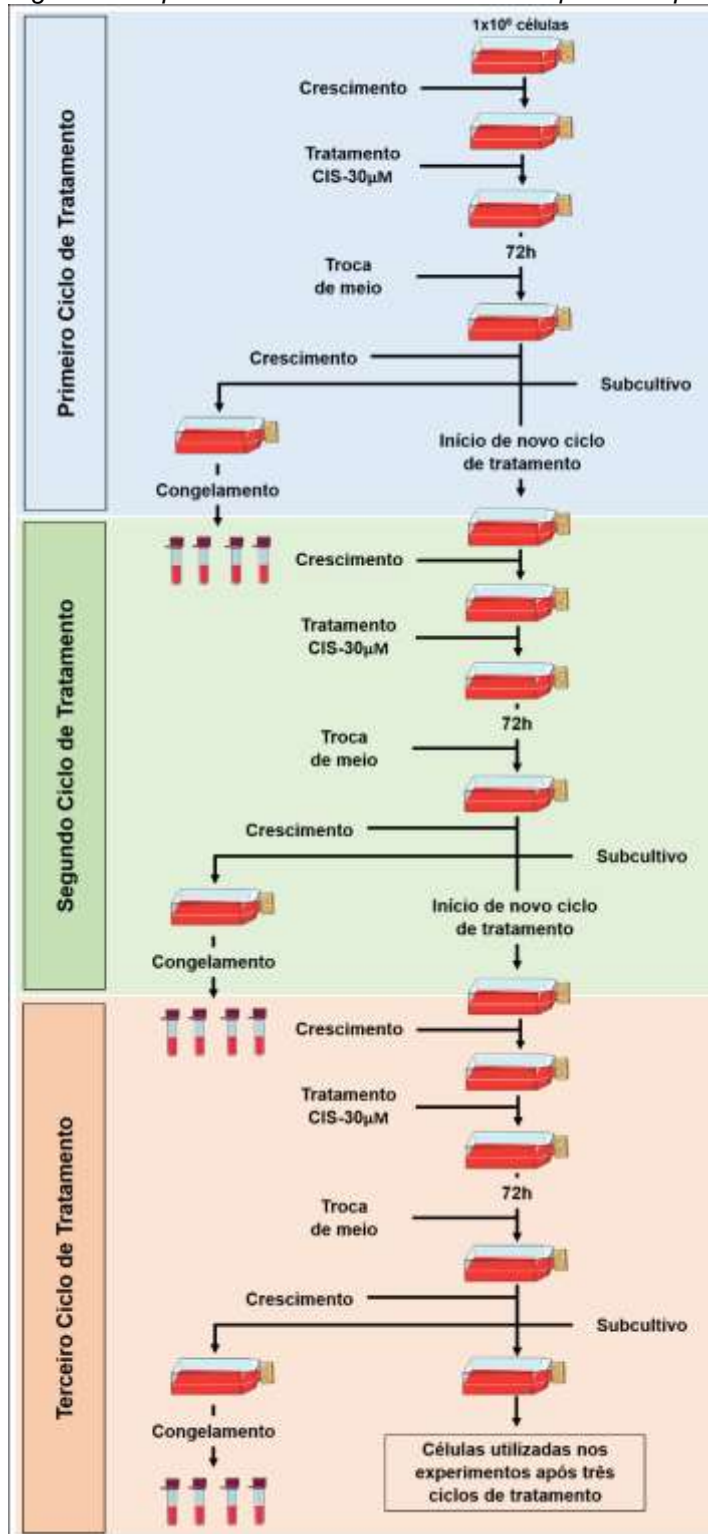
Após um período de tratamento de aproximadamente três semanas, as células voltaram ao crescimento normal e foram então subcultivadas em novas garrafas, algumas para serem armazenadas após criopreservação e outras para serem utilizadas em novos ciclos de tratamento. Novamente, as células foram expostas a uma concentração de $30\mu M$ de cisplatina, por 72h.

Uma vez atingido um ótimo nível de confluência, as células foram subcultivadas novamente, distribuindo células para criopreservação e para iniciar o terceiro ciclo de tratamento. Após esse 3º tratamento, o número de células viáveis na garrafa aumentou significativamente, indicando um perfil mais resistente das células ali presentes.

Decidiu-se, então, avaliar as mudanças nos perfis de ambas as linhagens de forma a se verificar se realmente as células estavam mais resistentes do que quando comparadas à sua versão parental.

A Figura 2 apresenta de maneira esquemática, cada um dos ciclos de tratamento com doses de IC_{50} de cisplatina ($30\mu M$).

Figura 2: Esquema de tratamento feito com $30\mu\text{M}$ de cisplatina.



Fonte: Do autor.

Nota: Foram mantidas duas garrafas de cultura durante o tratamento, tanto para A549-P (não tratada), quanto para A549-R30 (tratada). Nesse esquema, as células são semeadas e após período de crescimento são tratadas. Decorridos as 72h de tratamento, o meio de cultura é trocado e as células são mantidas até que atinjam novamente a confluência, quando são subcultivadas em outras duas garrafas, das quais uma será congelada e a outra seguirá para novo tratamento.

5.3 Ensaio de Viabilidade por Resazurina

As células de linhagens humanas de câncer de pulmão de células não pequenas foram testadas sob os efeitos da cisplatina por meio do ensaio de resazurina, método também utilizado por Moura e colaboradores (2017), Rozatto (2012), Silva (2008) e Sobhanifar (2018). Nesse ensaio, a resazurina, de cor azul, é reduzida a resofurina, de cor rosa e fluorescente, permitindo assim avaliação espectrofotométrica da viabilidade celular sob certas condições. Para isso, foram incubadas 1×10^4 células por poço em microplaca de 96 poços com fundo chato. Após período de 48h, as placas foram tratadas com concentrações crescentes de cisplatina (6,25; 12,5; 25; 35; e $50 \mu\text{M}$), de maneira a encontrar o IC_{50} de cada linhagem. Decorrido o tempo de tratamento (48h), o meio foi retirado e adicionado meio novo contendo 15% de resazurina. Após 4h de incubação, foi realizada a análise da fluorescência emitida pela resofurina por meio da espectrofotometria no comprimento de onda 570 nm, com referência a 600 nm em leitor ELISA Zenyth 200rt para microplaca. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.4 Ensaio de *Doubling Time*

Para avaliar se o crescimento celular se encontrava alterado nas células resistentes, o ensaio de doubling time foi realizado. Nele é possível verificar o tempo necessário para que a população celular dobre sua quantidade. Assim, no dia 0, 2×10^4 células foram semeadas em placas de 24 poços. A cada dia, a partir do dia 1, durante 7 dias, as células de três poços foram coletadas e contadas em câmara de Neubauer.

5.5 Ensaio Clonogênico

O ensaio clonogênico mede a capacidade das células de reterem sua capacidade de proliferação para formarem uma grande colônia ou clones, quando submetidas a um tratamento citotóxico. Por meio deste ensaio, é possível avaliar a influência de uma vasta gama de doses de um dado tratamento sobre a cultura celular (MUNSHI, *et al.*, 2005; FRANKEN, *et al.*, 2006; ADAN, *et*

al., 2016). Além disso, fazendo alusão a uma única célula *in vivo*, que num sítio primário invade tecidos adjacentes (invasão), migra para outra área longe do local inicial (migração) e acaba formando um novo tumor (metástase), este ensaio permite avaliar, ainda que *in vitro*, a capacidade dessa célula de sobreviver ao tratamento e proliferar, permitindo assim a investigação de um dado agente quimioterápico sobre a progressão tumoral. Nesse primeiro momento, as células parentais foram semeadas em baixa densidade (200 células por placa de 35mm de diâmetro), de tal forma que as células fiquem aderidas, porém isoladas, decorridas 24h de plaqueamento. Após adesão, as culturas foram tratadas com cisplatina nas concentrações de 0,3125; 0,625; 1,5; 2,5 e 5 μ M, por 48h. Após o período de tratamento, o meio foi substituído por meio fresco livre da droga e as placas foram mantidas em estufa a 37 °C, contendo 5% DE CO₂, por 10 dias. Decorrido esse período, as células foram lavadas com PBS e fixadas por 20 minutos com metanol P.A. (Sigma Aldrich LTDA, Brasil). Após secagem, as amostras foram coradas com solução Giemsa 1:4 (Sigma Aldrich LTDA, Brasil), por 5 minutos, em seguida lavadas com água destilada.

A contagem do número de colônias foi realizada com auxílio de estereomicroscópico (aumento 20x). Para isso, foram consideradas para análise as colônias que apresentarem número de células superior a 50/colônia. Os dados serão representados pela média de dois experimentos independentes

5.6 Ensaio de Migração

Para avaliar a capacidade migratória da linhagem parental e de sua contraparte resistente, o ensaio de cicatrização de ferida (do inglês, wound healing) foi realizado. Nesse ensaio, 1x10⁵ células foram semeadas em placas de 24 poços. Após 48h, o poço foi lavado com solução PBS e em seguida uma ferida é realizada na monocamada de células com auxílio de uma ponteira de 200 μ L e uma régua, previamente autoclavadas e esterilizadas. Mais uma vez o poço foi lavado com PBS para retirada de possíveis células que pudessem estar soltas. Então, foi adicionado meio DMEM suplementado com 1% de SBF, porcentagem essa, essencial para que as células continuassem vivas, mas não

se proliferassem. Em seguida, o centro do poço foi marcado com um marcador permanente, na região inferior externa.

Com a ajuda de um microscópio invertido as fotografias foram tiradas utilizando a câmera de um *smartphone*, com magnificação de 40x. Em um primeiro momento, o limite inferior do campo de visão foi delimitado pelo ponto marcado previamente no fundo de cada poço. Após a primeira fotografia, o ponto feito com o marcador permanente é colocado então na borda superior do campo de visão. Dessa forma, foram tiradas duas fotografias para cada poço.

Para cada poço, foram feitas fotografias nos tempos 0h (dia da realização da ferida), 24h, 48h e 72h. Cada uma das imagens foi levada ao programa ImageJ, no qual foi possível avaliar o grau, em porcentagem, de cicatrização da ferida em relação à área analisada.

5.7 Ensaio de Micronúcleo

Para avaliar o nível e as características das alterações encontradas nas populações celulares parentais e resistentes, o ensaio de micronúcleo foi realizado. Para isso, as células foram plaqueadas em placas de 35mm na concentração de 8×10^4 células/poço. Após período de 48h, as células foram tratadas em concentrações crescentes de cisplatina (1,8; 3,75; 7,5; 15; 30; e 60 μ M). Decorridos 48h de tratamento, o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados e novo meio de cultura foi adicionado. Além disso, cada poço recebeu citocalasina B na concentração de 3 μ g/mL. As células foram deixadas em cultura por mais 42h, período esse referente a aproximadamente um ciclo celular e meio. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado e adicionado em um tubo de centrífuga de 15mL. Os poços foram lavados com PBS e novamente o conteúdo foi adicionado ao tubo de centrífuga. Em seguida, as células foram desprendidas enzimaticamente com tripsina, cuja inativação ocorreu utilizando o meio de cultura contido no tubo de centrífuga. Logo após, o tubo foi levado à centrífuga a 1200rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado. O pellet formado no fundo do tubo foi dissolvido e então a solução hipotônica foi adicionada. Após ser divulsionado, o material foi levado novamente à centrífuga por mais 5 minutos. Decorrido o tempo, o sobrenadante foi novamente descartado e uma solução fixadora de metanol e ácido acético, na concentração

de 3:1, respectivamente, foi adicionada. Após ser bem homogeneizado, o material foi levado mais uma vez à centrífuga, por mais 5 minutos. Logo após, parte do sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta pasteur, ficando no tubo aproximadamente 0,5ml de solução, que foi deixada em temperatura de 8°C overnight.

No dia seguinte, já com as lâminas lavadas e repousadas previamente em Becker com água destilada gelada, o material foi homogeneizado e, então, as células foram distribuídas nas lâminas. Após, a secagem delas, no dia seguinte, as lâminas foram coradas com giemsa por 5 minutos. Decorrido o tempo, a análise das lâminas foi realizada.

Para análise, primeiramente foram avaliados o Índice de Divisão Nuclear (IDN) dos controles de cada linhagem (parental e resistente). Nessa avaliação, buscou-se dividir as células encontradas em mononucleadas, binucleadas, trinucleadas ou tetranucleadas. Além de se avaliar o índice de células apoptóticas e necróticas encontradas em cada amostra. Para o IDN, foram contadas um total de 500 células. O IDN é calculado levando-se em consideração a seguinte fórmula:

$$IDN = \frac{(M1 \times 1) + (M2 \times 2) + (M3 \times 3) + (M4 \times 4)}{\text{células contadas}}$$

Nessa fórmula a soma do número de células mononucleadas (M1) multiplicado por 1 + o produto do número de células binucleadas (M2) multiplicado por 2 + o número de células trinucleadas (M3) multiplicado por 3 + o número de células tetranucleadas (M4) multiplicado por quatro é dividido pela quantidade de células contadas.

Após a coleta de dados do IDN, as mesmas lâminas foram novamente avaliadas. Dessa vez, em um total de 1000 células contadas, buscou-se classificar o tipo de dano que cada célula apresentava dividindo-os em micronúcleo (MN), ponte (P), broto (B), micronúcleo + ponte (MN + P), micronúcleo + broto (MN + B), ponte + broto (P + B), ou ainda micronúcleo + ponte + broto (MN + P + B). Além disso, nessa análise também foi contado o número de células apoptóticas ou necróticas encontradas na população celular.

5.8 Ensaio de Citogenética

A obtenção de células metafásicas foi realizada de acordo com o procedimento padrão como descrito por Castro-Gamero *et al* (2013). Após o tempo de cultura, as células foram expostas a uma concentração final de colchicina de 5 ng/ml e incubadas a 37°C por 1-6 horas. Após o tempo de incubação, as células, quando aderentes, foram desprendidas usando uma solução de tripsina/EDTA. Em seguida, a suspensão obtida foi centrifugada por 15 minutos a 1000 rpm.

O tratamento hipotônico foi realizado com 0.075 M KCL por 15 minutos a 37°C. A fixação foi realizada com solução de metanol:ácido acético na concentração 3:1, seguida de duas lavagens na concentração de 2:1. As lâminas foram preparadas e envelhecidas por 2-3 dias, expostas a digestão enzimática com 1% tripsina e coradas com 1% Giemsa para a obtenção de Bandas GTG. A análise citogenética foi realizada de acordo com os critérios da ISCN (2009), que determina os critérios de alterações cromossômicas clonais (CCAs). Porém, alterações não clonais (NCCAs) foram consideradas no estudo para fins de determinar melhor os níveis de heterogeneidade cromossômica. CCAs serão definidas como alterações presentes em 5-10% das figuras mitóticas e NCCAs como aquelas observadas em menos de 5%.

5.9 Análise Estatística

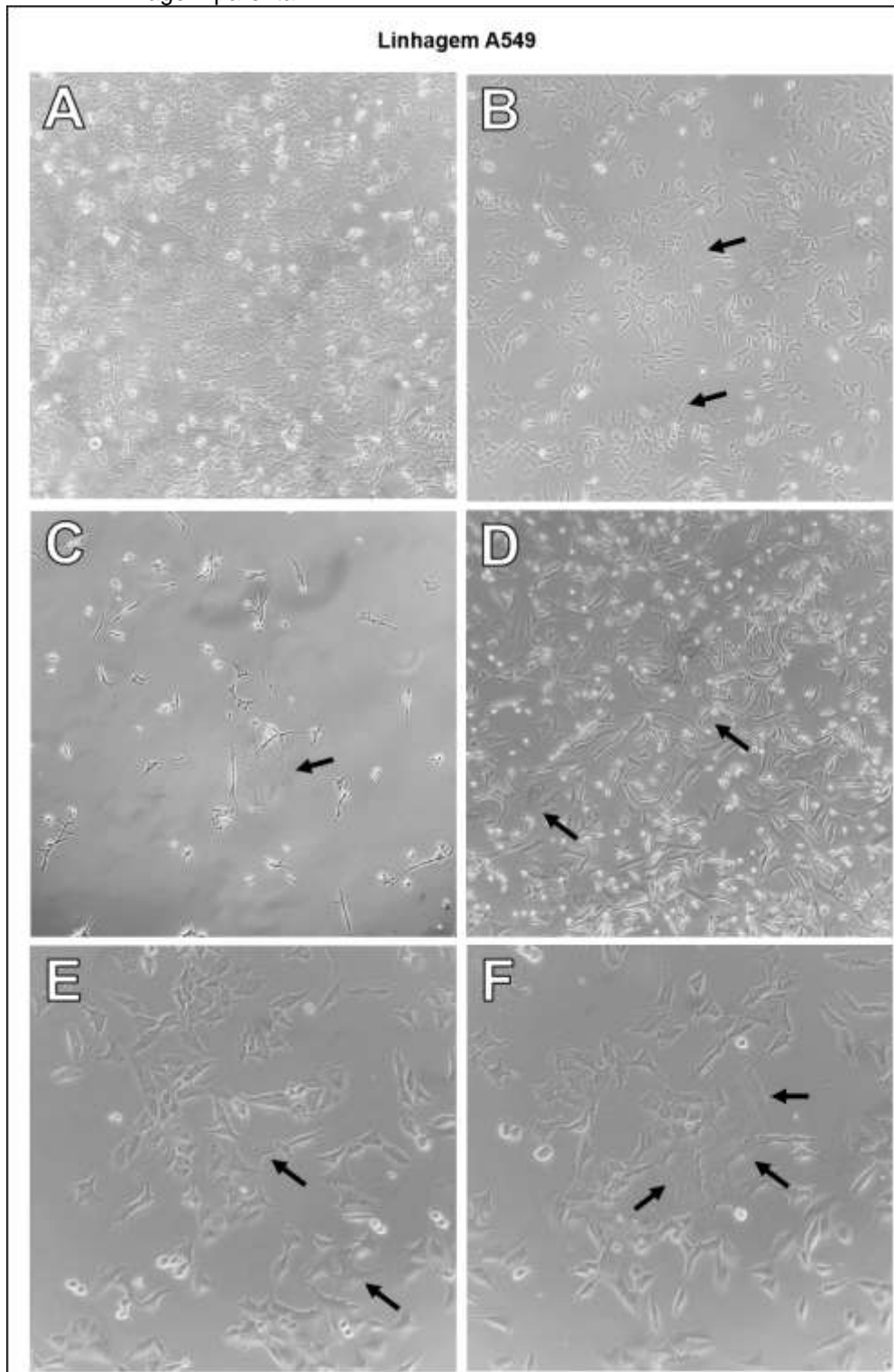
A análise estatística foi realizada por meio do Teste T não pareado, com pós-teste de Tukey no programa GraphPad Prism 5. Foram consideradas estatisticamente significantes aquelas diferenças com $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 A linhagem A549-R30 apresenta mudança de morfologia

As primeiras indicações de mudança na biologia celular puderam ser vistas quando da observação das células sob microscopia óptica. As diferenças morfológicas foram constatadas após o sexto mês de tratamento, depois do terceiro ciclo de exposição à 30uM de cisplatina (Figura 3). Na Figura #A, encontra-se a representação celular da linhagem A54 parental (A549-P). As Figuras 3B-3F trazem representações das células tratadas. Na Figura 3B, com uma confluência de 40-50%, é possível notar que as células assumiram formato mais espiculado. As setas pretas chamam atenção para aquelas células cuja morfologia se distinguia das demais. Na Figura 3C, em baixa confluência, é possível verificar a presença de células muito maiores de formato irregular (seta preta). Na Figura 3D, é evidente que mesmo sob alta confluência, algumas células apresentam perfis diferentes, com formatos irregulares e tamanhos maiores indicadas pelas setas pretas. Nas Figuras 3E e 3F, em maior aumento, fica evidente as diferenças morfológicas das células indicadas pelas setas pretas em relação as demais.

Figura 3: A linhagem resistente (A549-R30) apresenta diferenças morfológicas em relação à linhagem parental.



Fonte: Do autor.

Legenda: A) Representação da linhagem parental (A549-P), em alta confluência. Aumento de 100x. B) Representação da linhagem resistente (A549-R30), em média confluência. Aumento de 100x. C) Em baixa confluência, logo após o terceiro ciclo de tratamento, célula da linhagem A549-R30 apresentando tamanho alterado (seta preta). Aumento de 100x. D) Células de A549-R30 com tamanho alterado, em alta confluência. Aumento de 100x. E) Setas indicando células de linhagem tratada com alterações morfológicas. Aumento de 400x. F) Outras células representantes da linhagem A540-R30 com morfologia alterada. Aumento de 400x.

O desenvolvimento de um fenótipo quimiorresistente é acompanhado por mudanças em diferentes características biológicas das células transformadas, sendo a mudança na morfologia celular uma delas (LUKYANOVA *et al.*, 2009). Essa observação também foi feita por McDermont e seus colaboradores (2014). Após 6 meses de tratamento com lapatinibe, os autores verificaram mudanças significativas na morfologia celular das células de câncer de mama HCC1954, que apresentavam, após o tratamento, limites celulares distintos e um formato celular mais plano.

Analisando as diferenças morfológicas de células de MCF-7 (câncer de mama) resistente à cisplatina e/ou a doxorubicina, Lukyanova e colaboradores (2009) verificaram, sob microscopia eletrônica, que as células resistentes demonstravam uma organização ultraestrutural mais complexa, com maior diferenciação. O número de microtúbulos aumentou e as fibras que compunham os microfilamentos de diferentes tamanhos eram evidentes. Além disso, as células resistentes apresentavam um complexo de Golgi mais ativo, com muitos corpos multivesiculares, cuja aproximação com a membrana plasmática poderia indicar o aumento do efluxo de substâncias através da membrana celular e, conseqüentemente, a diminuição da quantidade de cisplatina e doxorubicina no citoplasma das células resistentes, garantindo assim menor atividade dessas substâncias.

Além disso, resulta amplamente conhecido que a proteína supressora de tumor p53 promove a sobrevivência celular ativando pontos de checagem do ciclo celular para facilitar o reparo do DNA ou induzir a morte celular apoptótica. No entanto, nas últimas duas décadas, tem sido estabelecido um mecanismo de resposta a agentes genotóxicos caracterizado por parada da proliferação (dormência), e que atua de maneira independente ao status da p53. Neste mecanismo, uma significativa proporção de células dormentes permanece viáveis e metabolicamente ativas por longos períodos de tempo (semanas) após o tratamento. Esta parada proliferativa é comumente acompanhada por um marcante aumento do tamanho celular, o qual pode refletir um processo de senescência prematuro induzido por estresse e/ou o desenvolvimento de células

poliploides “gigantes”, tanto com núcleo muito aumentado ou vários núcleos (MIRZAYANS *et al.*, 2017).

De forma interessante, avaliando os efeitos da cisplatina sobre o processo de endoduplicação e catástrofe mitótica em adenocarcinomas de cólon de rato (linhagem celular DHD/K12/TRb), Puig e colaboradores (2008) verificaram que após 3h de exposição à cisplatina, as células mantidas em cultura apresentavam, depois de 7 dias, mudanças morfológicas em seus núcleos, que se apresentavam aumentados em granulosidade e tamanho. Os autores também verificaram que essas células tumorais gigantes adquiriam um fenótipo parecido com senescência, o que foi demonstrado pela expressão de SA- β -galactosidade.

Altamente expressa em células senescentes, essa enzima tem a particularidade de ser ativa em pH baixo, embora não se saiba qual sua verdadeira relação com os mecanismos envolvidos no desencadeamento ou manutenção do fenótipo senescente (ALTHUBITI e MACIP, 2016). No presente estudo, após os primeiros tratamentos com cisplatina, as células entraram em um período de aproximadamente 5-6 semanas no qual não havia sinais de divisão celular e a morfologia das células se mostrava bastante alterada. Decorridas essas semanas, as células começaram a formar pequenas colônias, que foram gradativamente voltando à sua atividade mitótica, invadindo assim toda a cultura.

O retorno ao ciclo de divisão celular, bem como a formação de pequenas colônias também foram notados por Puig e colaboradores (2008). Procurando investigar em detalhes os motivos que levaram as células a saírem do seu fenótipo senescente, os autores realizaram uma hibridização genômica comparativa, demonstrando que todas as linhagens chamadas de *escape cell lines* (em tradução literal: linhagens celulares de escape) – em relação às células parentais – apresentavam aberrações cromossômicas não balanceadas. Curiosamente, como demonstrado pelos autores, todas as linhagens de escape exibiam ganhos na porção distal do braço longo do cromossomo 4 (+4q32-q34 e +4q42-q44). Ademais, todas as linhagens que saíram do fenótipo de senescência expressavam semelhantes perdas do braço p do cromossomo 19, bem como ganhos ou perdas de cromossomos inteiros, tais como do cromossomo 9, 11, 12, 15 e X. Outra característica importante das linhagens de

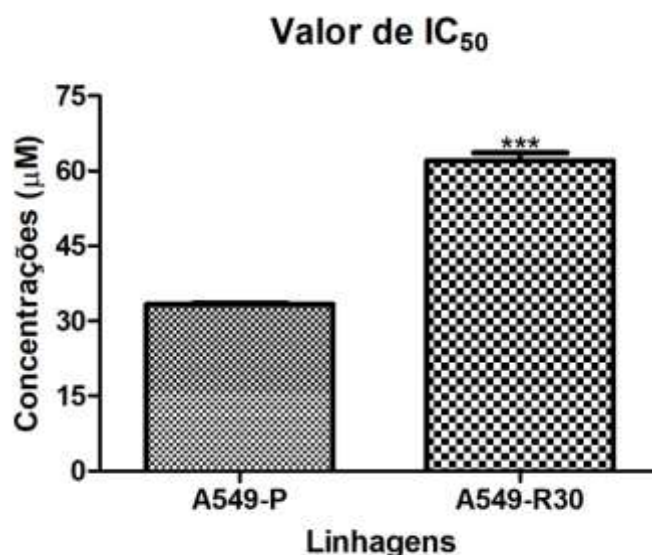
escape apontada pelos autores foi a maior resistência dessas células à cisplatina, quando comparadas as células parentais.

Desse modo, é possível inferir que a instabilidade cromossômica, associada a uma reorganização estrutural celular interna, confere à célula meios de resistir ao tratamento com cisplatina, dando origem, assim, a um perfil morfológico distinto e uma população celular quimiorresistente.

6.2 A linhagem A549-r30 apresenta maior IC₅₀

Tendo em vista a mudança morfológica apresentada pelas células, para confirmar o perfil resistente da linhagem A549-R30, após o terceiro ciclo de tratamento, o ensaio de viabilidade celular com resazurina foi realizado. O resultado pode ser conferido na Figura 4. Após os ensaios, o IC₅₀ para a linhagem parental (A549-P) foi de 33,34 $\mu\text{M} \pm 0,33$, enquanto para a linhagem A549-R30 foi de 63,39 $\mu\text{M} \pm 1,55$, um aumento de 90% (ou 1,9 vezes), quando comparado à linhagem parental, A549-P.

Figura 4 - Valor de IC₅₀ na linhagem resistente comparada à linhagem parental foi maior após 3 ciclos de tratamento.



Fonte: Do autor.

Nota Depois de 3 ciclos de tratamento já foi possível observar um aumento significativo no valor de IC₅₀ da linhagem, então, à célula parental. Valores apresentados como média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por teste t de Student não pareado. $p < 0,005$.

O IC₅₀ é a concentração de uma determinada substância capaz de inibir 50% do crescimento de uma dada linhagem celular. No trabalho de Barr e colaboradores (2013), após 06 meses de tratamento, eles verificaram um aumento significativo de mais de 15 vezes na linhagem resistente A549, quando comparada a sua linhagem parental. Após vários ensaios incluindo proliferação, ensaio de clonogenicidade e análise do ciclo celular, os autores puderam notar, além do aumento no valor de IC₅₀, diferentes perfis das células resistentes em relação as suas correspondentes parentais. Uma das linhagens celulares avaliadas pelos autores foi a de CPCNP A549, sendo essa umas das linhagens mais resistentes das quatro caracterizadas. De relevante interesse é o fato de que em níveis basais e em resposta ao aumento das concentrações de cisplatina, houve um aumento da quantidade de células na fase G₀/G₁ da linhagem A549 resistente em comparação com sua respectiva linhagem parental.

É notável que um dos checkpoints celulares mais comumente afetados na resposta ao tratamento da cisplatina é a parada G₂/M, na qual *P21* (um dos vários genes ativados por *P53* como resultado da exposição à cisplatina) está envolvido tanto na indução, quanto na sustentação desta parada do ciclo celular ao inibir CDK1. Contudo, após o dano de DNA, é comum que a acumulação de p21 leve a parada do ciclo na fase G₀/G₁, além de inibir a ciclina E/CDK2 e assim inibir a transição G₁/S. A indução de *p21* mediada por *p53* leva ainda à baixa regulação de ICBP90, que é observada durante as fases G₁/M e G₂/M. Uma vez que essa proteína está envolvida na replicação de DNA e na regulação do ciclo celular, sua baixa regulação pela p21 é um mecanismo importante de parada do ciclo (CHOI *et al.*, 2014; KARIMIAN *et al.*, 2016). Dessa forma, segunda Barr e colaboradores (2014), o aumento da quantidade de célula em G₀/G₁ pode estar relacionada ao status tipo selvagem da p53 presente na linhagem A549, já que a ativação de p53 pelo dano de DNA causado pela cisplatina pode apresentar vários efeitos nas células.

A família de fatores de transcrição MYC diretamente e indiretamente regula vários genes envolvidos na proliferação celular, metabolismo da célula, indução de apoptose, bloqueio do processo de diferenciação e iniciação e promoção do câncer. A abundância da oncoproteína MYC está intimamente correlacionado com a quimiorresistência em muitos tipos de tumores incluindo

câncer de próstata, câncer de ovário, melanoma, câncer de pulmão, dentre outros. Por exemplo, a expressão de c-MYC, uma das oncoproteínas da família, MYC é elevada em populações de células tumorais que sobreviveram à quimioterapia baseada em platina *in vivo*. Dessa forma, sob estresse genotóxico a proteína MYC protege o genoma de células cancerosas do dano de DNA, permitindo assim que as células sobrevivam por mais tempo (KUMARI *et al.*, 2017).

O mecanismo pelo qual células transformadas aumentam sua quimiorresistência podem ser: 1) aumento da quantidade (e/ou atividade) da maquinaria celular de reparo de DNA; 2) supressão ou inativação da maquinaria pró-apoptótica; e 3) destoxificação e aumento do efluxo de substâncias genotóxicas. Evidências clínicas mostram que uma vez que as células cancerosas adquirem resistência à cisplatina, por exemplo, naturalmente desenvolvem resistência cruzada com uma ampla variedade de outros agentes quimioterápicos (KUMARI *et al.*, 2017).

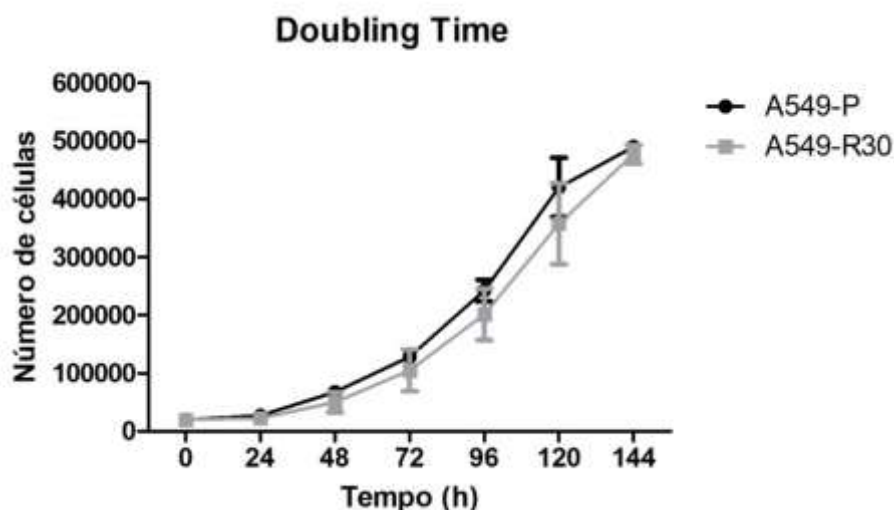
Aqui, a resistência demonstrada pelas células tratadas pode estar relacionada a diferentes perfis citogenéticos da população celular, bem como a diferentes padrões de expressão de genes que regulam o ciclo celular. Além disso, mesmo apresentando diferença significativa em relação à célula parental, a baixa taxa no aumento de IC₅₀ pode estar relacionada ao tempo de tratamento, uma vez que o desenvolvimento de linhagem resistente *in vitro* pode levar de 3 a 18 meses (McDermott *et al.*, 2014).

6.3 A linhagem resistente apresenta o mesmo *doubling time* que a célula parental

Para verificar se havia diferença entre os tempos de crescimento das linhagens parental e resistente, o ensaio de *doubling time* foi realizado. Nele, as células de ambas as linhagens foram semeadas – no dia 0 – na mesma quantidade (2×10^4 células por poço) em placas de 24 poços. A cada dia, o número de células foi contado e o gráfico de crescimento celular (Figura 5) pôde ser montado. Diferentemente do que foi suposto, as células resistentes não apresentavam crescimento superior quando comparadas as células da linhagem

parental, não havendo diferença significativa entre o número de célula contado a cada dia. Para a célula parental, o tempo de dobramento da célula foi de 31h e 27min \pm 19,8min, enquanto para a célula da linhagem A549-R30 foi de 31h e 12min \pm 9,6min (como demonstrado na Figura 6).

Figura 5 - Número de células das linhagens A549-P e A549-R30



Fonte: Do autor.

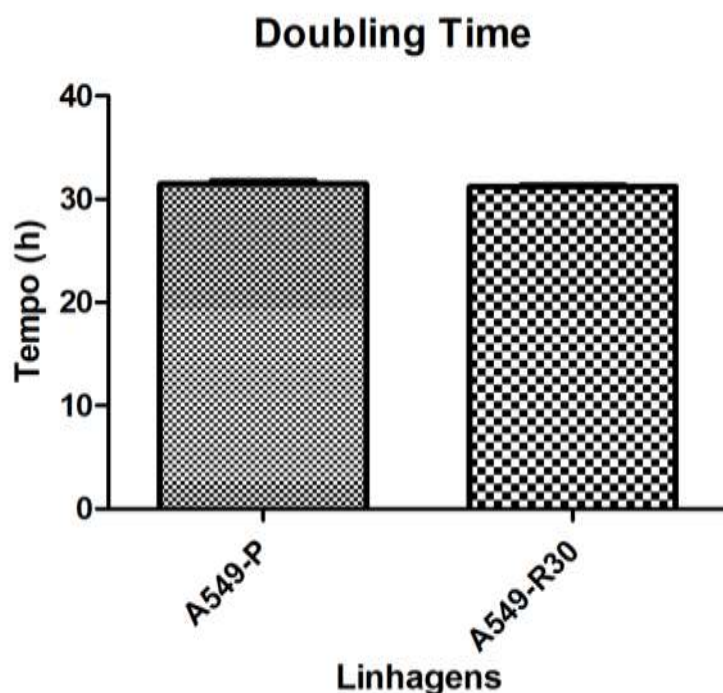
Nota: O ensaio foi realizado a cada 24h, os pontos e barras representam a média e o desvio padrão da contagem de três poços para cada linhagem. Valores expressos da média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por test t Student pareado. $p < 0,05$.

Doubling time é o termo usado para representar o tempo necessário em que as células de uma cultura levam para duplicarem sua população, retratando, assim, a capacidade proliferativa ao longo das passagens da cultura celular (KIM, 1997). Tal dado mostra-se relevante na medida em que imagens de ressonância magnética (RM) em conjunto com um modelo logístico de crescimento de tumores mostram que as estimativas da taxa de proliferação podem discriminar a sobrevivência do paciente e a resposta à terapia (ORAIPOULOU *et al.*, 2017).

A partir da análise do gráfico, é possível verificar que em ambas as linhagens taxas de crescimento semelhantes foram obtidas e sem diferenças estatisticamente significativas entre si. No entanto, apesar da ausência de diferença estatística, é possível notar que a curva de crescimento da linhagem resistente – que mostra sua capacidade proliferativa – se apresenta, sutilmente, menor que a linhagem parental para um mesmo tempo no eixo x. Estudos

sugerem que, hipoteticamente, a taxa de crescimento reduzida constitui-se de um evento significativo na sobrevivência de células cancerosas após a indução de um grande estresse como o induzido pelo tratamento com cisplatina. De fato, já é bem estabelecido que células com alta capacidade proliferativa são mais vulneráveis aos efeitos citotóxicos das drogas do que as células quiescentes (BORST, 2012; NIKOUNEZHAD *et al.*, 2016).

Figura 6 - Tempo de dobramento das duas linhagens analisadas.



Fonte: Do autor.

Nota: Não houve diferenças significativas entre as linhagens A549-P e A549-R30 no que se refere ao *doubling time*. Valores expressos da média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por test t Student pareado. Sem diferença significativa.

A diminuição na taxa de crescimento da linhagem resistente também foi vista em outros trabalhos. Nikounezhad e colaboradores (2016) verificam uma taxa de crescimento menor em 3 linhagens de câncer de ovário resistentes à cisplatina. Trabalhando com células de câncer hepatocelular humano, Zhou e colaboradores (2010) desenvolveram uma linhagem resistente à cisplatina que, durante o ensaio de crescimento celular, apresentou um crescimento um pouco mais lento em relação à parental. Outros autores que encontram resultados parecidos foram Wosikowski e colaboradores (2000), que notaram que células

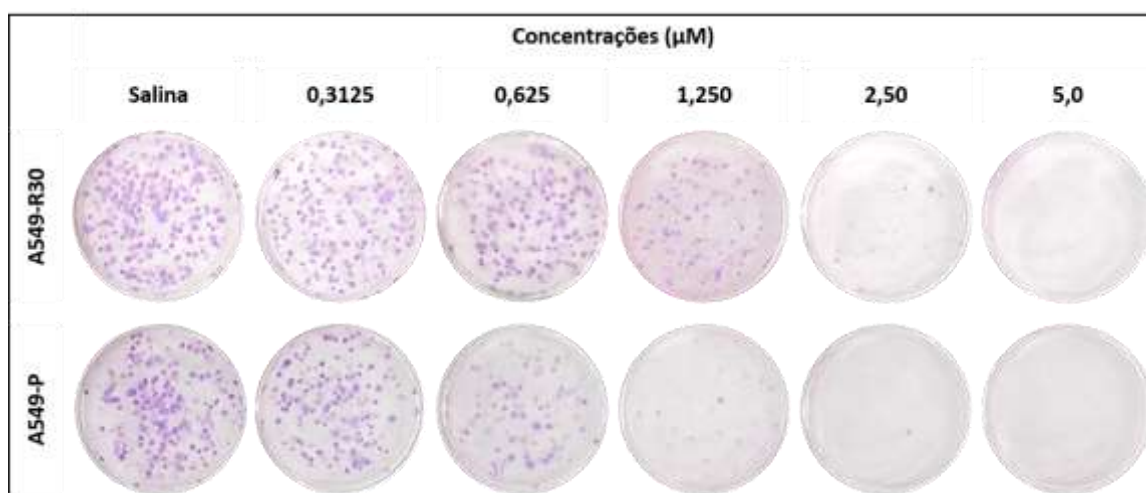
de câncer de mama resistentes apresentavam perfil de crescimento mais lento que a célula parental MCF-7.

Esses achados, somados ao que foi encontrado aqui, sugerem que o crescimento lento é um componente da resistência aos quimioterápicos. A reduzida taxa de crescimento celular pode, assim, constituir um importante evento na sobrevivência das células após o estresse causado pelo tratamento com cisplatina (NIKOUNEZHAD *et al.*, 2016).

6.4 O ensaio clonogênico

As células foram testadas para se verificar a capacidade clonogênica de ambas as linhagens. Após plaqueamento, tratamento e crescimento das colônias, as placas foram coradas e o perfil de colônias encontrado pode ser verificado na Figura 7.

Figura 7 - Representação da capacidade clonogênica de ambas as linhagens (A549-P e A549-R30).



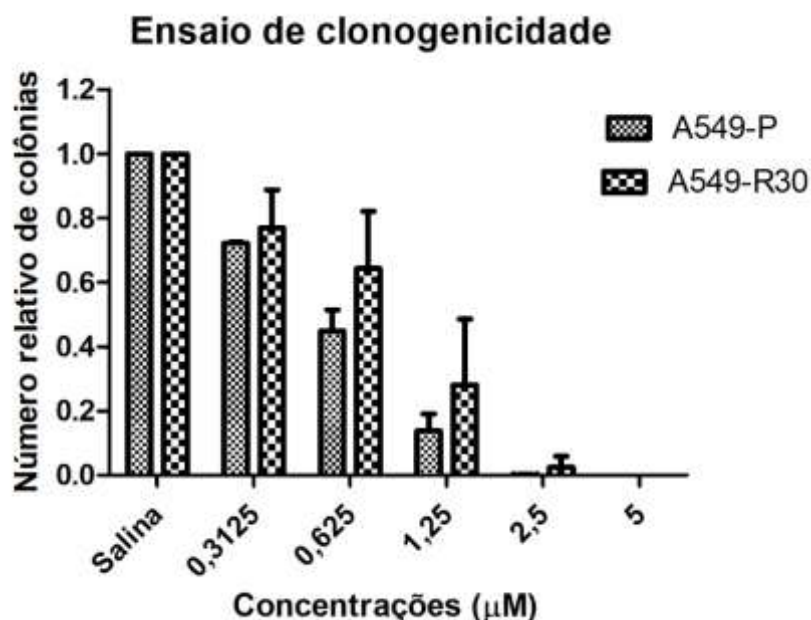
Fonte: Do autor.

Nota: Os tratamentos foram feitos com cisplatina nas doses de 0,3125, 0,625, 1,25, 2,50 e 5µM.

O valor relativo de colônias encontrado em cada tratamento pode ser visto na Figura 9. O caráter resistente da linhagem A549-R30 é notado com um menor efeito da cisplatina sobre o crescimento clonogênico na concentração de 1,250µM. A partir desses dados, foi possível calcular o IC₅₀-clonogênico para ambas as linhagens. Para a linhagem parental, o IC₅₀-clonogênico foi de 0,52µM, enquanto

para a linhagem resistente esse valor foi de $0,63\mu\text{M}$, um aumento de aproximadamente $1,21\text{x}$ o valor encontrado para a linhagem A549-P.

Figura 8 - Ensaio de clonogenicidade comparando o crescimento relativo de colônias para as linhagens A549-P e A549-R30.



Fonte: Do autor.

Nota: É possível notar maior resistência por parte da linhagem A549-R30, cujo $\text{IC}_{50\text{-clonogênico}}$ foi de $0,63\mu\text{M}$. Para a linhagem parental, o $\text{IC}_{50\text{-clonogênico}}$ foi de $0,52\mu\text{M}$. Valores expressos da média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por test t Student pareado. Sem diferença significativa.

Assim como verificado por Ballestreri e colaboradores (2018), ao trabalhar com células de CPCNP, o tratamento com cisplatina reduziu a capacidade proliferativa de maneira dose-dependente na linhagem parental. Trabalhando com linhagens de câncer de pulmão (A549 e H460), Toulany e colaboradores (2014), bem como Liang e colaboradores (2013) encontraram o mesmo efeito do tratamento com cisplatina sobre a capacidade de formação de colônias dessas linhagens de câncer de pulmão.

Embora não tenha havido diferença significativa entre os valores de IC_{50} das linhagens, foi possível encontrar uma tendência de maior sobrevivência da linhagem A549-R30, como pode ser verificado pelas figuras representativas das colônias, bem como pela Figura 8. O ensaio de clonogenicidade determina o potencial proliferativo que uma única célula possui quando é mantida sua função reprodutiva e, assim, ela é capaz de formar colônias ou clones (BALLESTRERI

et al., 2018). A redução na capacidade de formação de colônias das células parentais deve ser então explicada pelo efeito citotóxico da cisplatina, que causa dano de DNA, formando adutos de platina-DNA. A formação desses adutos deve ser uma etapa anterior à clivagem do DNA, que pode ter a formação de micronúcleo como possível consequência (SIDDIK, 2003).

Quando uma dada substância chega ao tumor, as células cancerosas têm um extenso arsenal de mecanismos de defesa. Uma droga deve então ser absorvida e o transporte defeituoso é um importante mecanismo de resistência. A saber, quando um medicamento consegue atingir as células transformadas, ele pode quase imediatamente ser expulso por um transportador dependente de ATP (GODEFRIDUS, 2018). Esse mecanismo de expulsão da droga deve ser ainda mais evidente nas células resistentes, como é o caso da A549-R30.

Outro mecanismo de resistência à cisplatina inclui mudanças nas vias regulatórias do controle do início e progressão da apoptose, o que poderia estar associado ao nível de expressão de BIRC5, um gene cuja expressão regula os fusos mitóticos e inibe a apoptose (BALLESTRERI *et al.*, 2018). Ademais, não é tão claro o mecanismo que leva à formação de resistência à quimioterapia, principalmente devido às diferenças tumorais de cada indivíduo. Contudo, Yang e colaboradores (2017) verificaram que, em uma linhagem de CPCP, o aumento da expressão de Beclin-1 estava associado ao fenótipo quimiorresistente da célula.

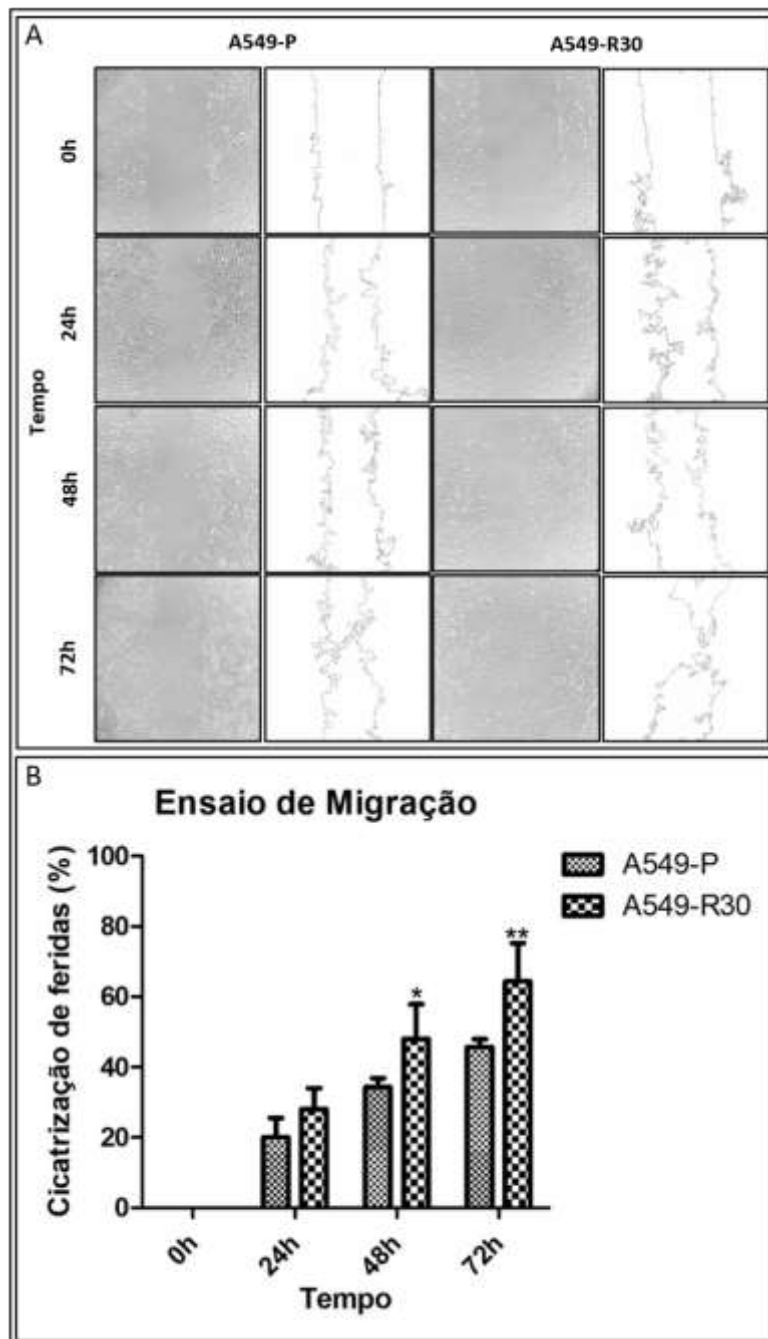
Como dito, vários mecanismos podem ser responsáveis pelo perfil resistente da linhagem A549-R30, alguns deles serão abordados mais à frente. Por ora, buscando avaliar a capacidade de migração e o nível de instabilidade cromossômica e a heterogeneidade tumoral, os ensaios de cicatrização de ferida e de micronúcleo e avaliação citogenética foram realizados.

6.5 A linhagem resistente apresenta maior capacidade de migração

O ensaio de migração por meio da técnica de cicatrização de feridas foi realizado para verificar os perfis de ambas as linhagens, A549-P e A549-R30. A Figura 9A representa de maneira esquemática, o processo de fechamento da ferida feita na monocamada de células, apresentando imagens representativas dos poços, bem como das áreas de cicatrização. Depois de 48h e 72h de ensaio,

foi possível verificar que a linhagem resistente (A549-R30) apresentou uma maior e significativa capacidade de migração, como pode ser observado na Figura 9B, com uma porcentagem de fechamento da ferida em torno de 48% e 64% para os tempos descritos, respectivamente.

Figura 94 - Ensaio de cicatrização de feridas mostrando a capacidade de migração das linhagens



Fonte: Do autor.

Legenda: A) Representação esquemática dos poços e das áreas de cicatrização de feridas após os tempos de 0h, 24h, 48h e 72h. B) Porcentagem de fechamento da ferida em porcentagem (%). Média de três experimentos independentes, mostrando desvio padrão. Teste Anova Two Way com pós teste de Bonferroni. $p < 0,05$.

Devido a esta maior capacidade migratória, é possível inferir que a linhagem resistente apresenta um comportamento concordante com transição epitélio-mesenquimal (do inglês EMT, epithelial-to-mesenchymal transition), o que está relacionado a uma maior malignidade. Essa associação de um fenótipo EMT com um processo de migração celular foi também demonstrado por Zhang e colaboradores (2017), que verificaram uma maior capacidade migratória nas células de CPCNP A549 também resistentes à cisplatina.

O significativo aumento do potencial metastático de linhagens de CPCNP resistente à cisplatina também foi observado por Shen e colaboradores (2019). Trabalhando com as linhagens A549 e H157, os autores também desenvolveram linhagens resistentes à cisplatina e então avaliaram por meio do ensaio de cicatrização de ferida o potencial de migração dessas linhagens, quando comparadas às linhagens parentais. Assim como no presente estudo, os autores verificaram que a habilidade de migração estava aumentada nas linhagens resistentes.

O processo de metástase tumoral pode ser categorizado em três estágios: invasão no tecido circundante, invasão dos vasos linfáticos e sanguíneos e chegada a um novo ambiente. A transição epitélio-mesenquimal desempenha um importante papel no processo de metástase tumoral, ocorrendo por meio de numerosas alterações celulares e moleculares. Ela descreve um processo biológico que promove consecutivas mudanças no fenótipo de células epiteliais, de tal forma que elas assumam características de células mesenquimais (GOMES *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2018).

Isso demonstra, então, que após três ciclos consecutivos de tratamento com cisplatina, foram selecionadas células com maior capacidade migratória, o que está relacionado a um perfil mais maligno por parte dessas células e que, na clínica, pode estar relacionado a uma menor resposta terapêutica dos pacientes CPCNP.

6.6 A linhagem resistente apresenta maior número de biomarcadores de instabilidade.

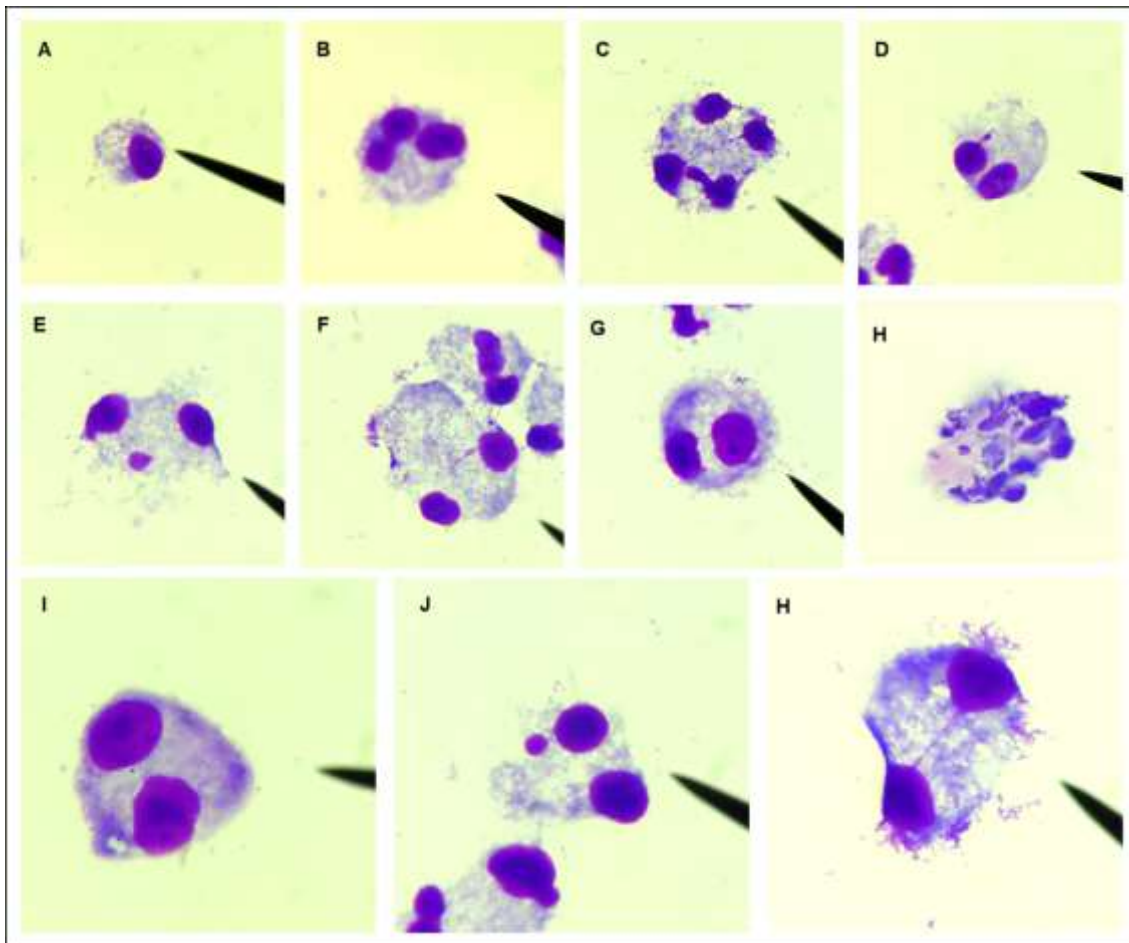
Depois de verificar que as células resistentes apresentavam um aumento significativo do valor de IC₅₀, assim como uma maior capacidade migratória, decidiu-se verificar o grau de instabilidade genômica, citostase e citotoxicidade, por meio do ensaio de micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit). Esse ensaio visa avaliar as populações de células contendo dois núcleos, de forma a levantar o número de células que apresentam biomarcadores de instabilidade e quais os seus tipos.

A taxa de micronúcleo em células humanas se tornou um dos testes citogenéticos padrões usados em genética toxicológica, e recentemente, nos estudos de instabilidade cromossômica. O ensaio de micronúcleo é feito avaliando-se a quantidade de micronúcleos em células binucleadas. Esse ensaio, permite, assim, a avaliação de quebras cromossômicas, perda de cromossomos, não disjunção, necrose e apoptose. Além disso, pode ser usado para avaliar também pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, cada um tendo diferentes mecanismos de origem (FENECH, 2006).

A figura a seguir (Figura 10) traz imagens representativas de cada tipo de biomarcadores de instabilidade, encontrados nas células A549: micronúcleo (MN), broto (B), ponte (P), micronúcleo + broto (MN + B), micronúcleo + ponte (MN + P), broto + ponte (B + P), micronúcleo + broto + ponte (MN + broto + ponte), apoptóticas, além de apresentar células mono-, bi-, tri- e tretranucleadas. Durante a análise das lâminas, também buscou-se quantificar as células necróticas, mas essas não foram encontradas e por isso não aparecem na figura, nem nos gráficos.

Adicionalmente, tecidos tumorais frequentemente apresentam morfologia nuclear anormais incluindo variabilidade no tamanho do núcleo, estrutura da cromatina anormal e irregularidades na forma nuclear. Em alguns tipos tumorais, como adenocarcinomas mamários, a presença de um núcleo atípico está associada a prognósticos desfavoráveis (GISSELSON *et al.*, 2001). No presente trabalho, foi possível verificar uma ampla variedade de núcleos atípicos quando da análise de ambas as células, como pode ser visto na Figura 10.

Figura 10 - Fotomicrografias de células representativas do ensaio de micronúcleo.



Fonte: Do autor.

Legenda: A) Célula mononucleada. B) Célula Trinucleada. C) Célula tetranucleada. D) Célula binucleada com broto. E) Célula binucleada com micronúcleo e broto. F) Célula binucleada com micronúcleo e ponte. G) Célula com broto e ponte. H) Célula apoptótica. Em destaque: I) Célula binucleada. J) Célula binucleada com micronúcleo. K) Célula binucleada com ponte. Aumento 1000x.

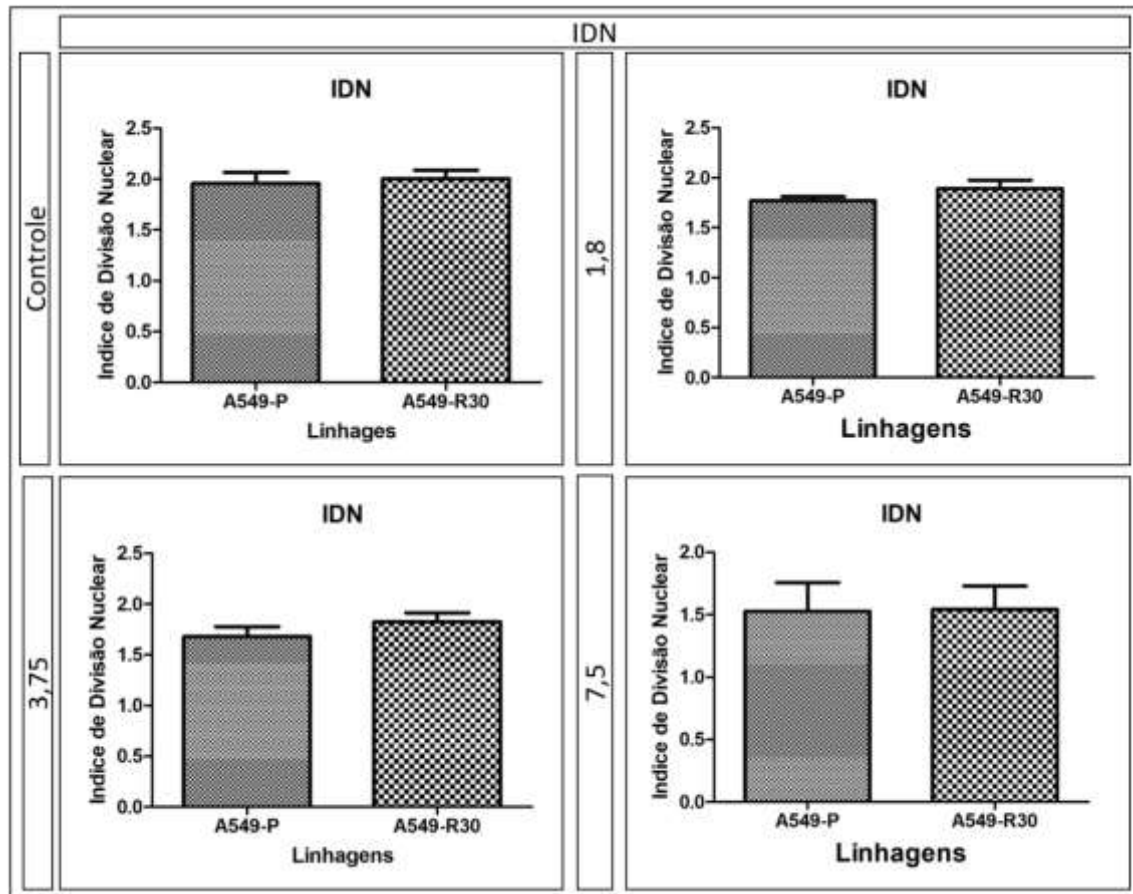
Assim, para análise das possíveis aberrações cromossômicas, primeiramente foram avaliadas 500 células por lâminas com o objetivo de verificar o Índice de Divisão Nuclear (IDN).

Uma vez que nas concentrações de tratamento 15, 30 e 60 μ M não foi possível encontrar o número de células para contagem (células em citostase), as lâminas desses tratamentos foram retiradas da análise, garantindo que sejam analisadas apenas células com capacidade mitótica intacta, como sugerido por FENECH (2006).

A Figura 11, apresenta os valores de IDN para as células tratadas com 0, 1,8, 3,75 e 7,5 μ M de cisplatina, onde se observa a ausência de diferença

significativa entre a linhagem parental e a linhagem resistente, condição necessária para iniciar a análise de biomarcadores de instabilidade cromossômica.

Figura 11 - Índice de Divisão Nuclear.

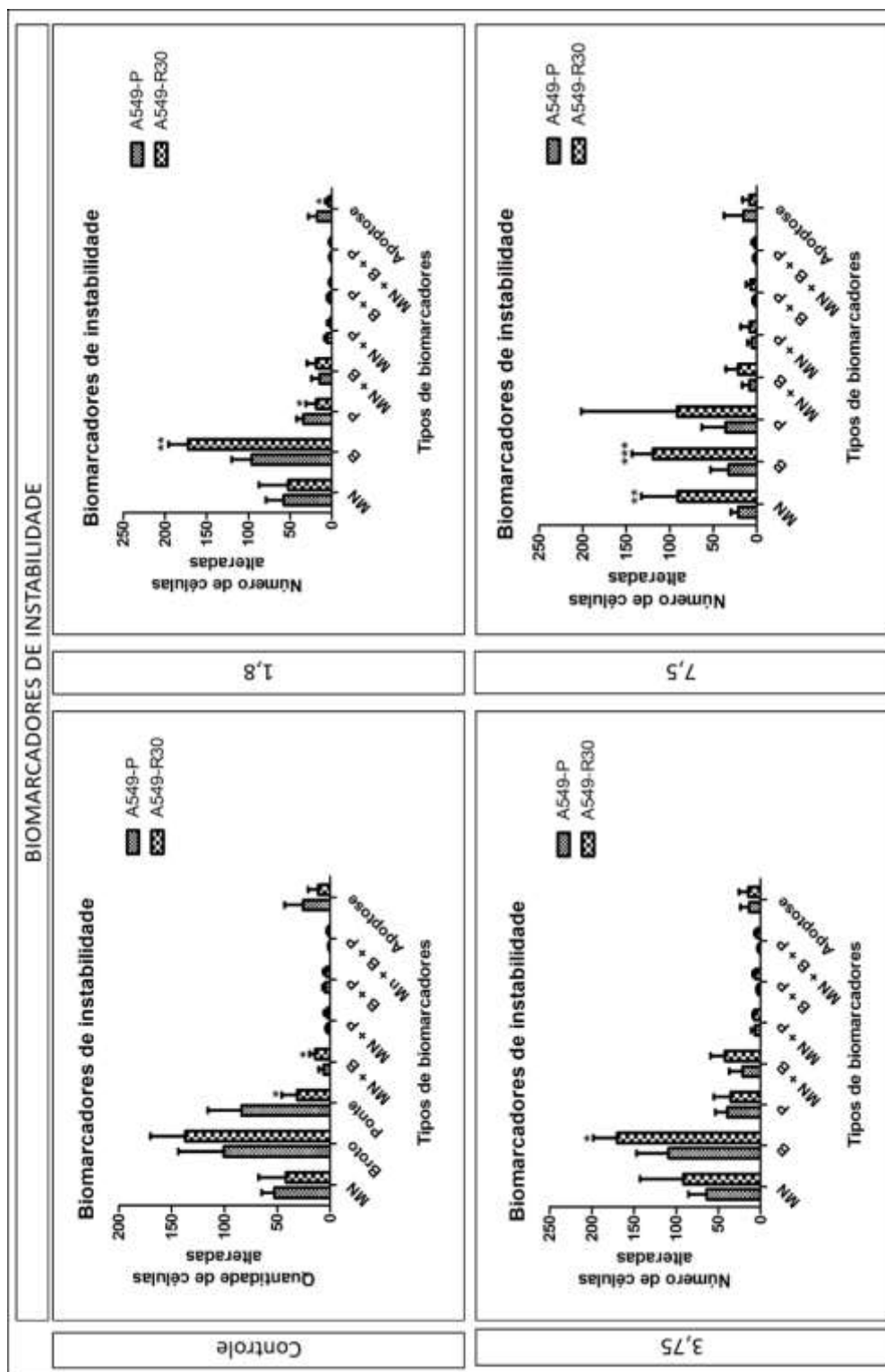


Fonte: Do autor.

Legenda: Comparação entre os IDN das linhagens parental e resistente quando tratadas com diferentes doses de cisplatina. Sem diferença significativa.

A Figura 12 apresenta a média de número de células alteradas para cada uma dos biomarcadores avaliados em cada uma das concentrações.

Figura 12 - Frequência de biomarcadores de instabilidade cromossômica encontradas em ambas as linhagens avaliadas

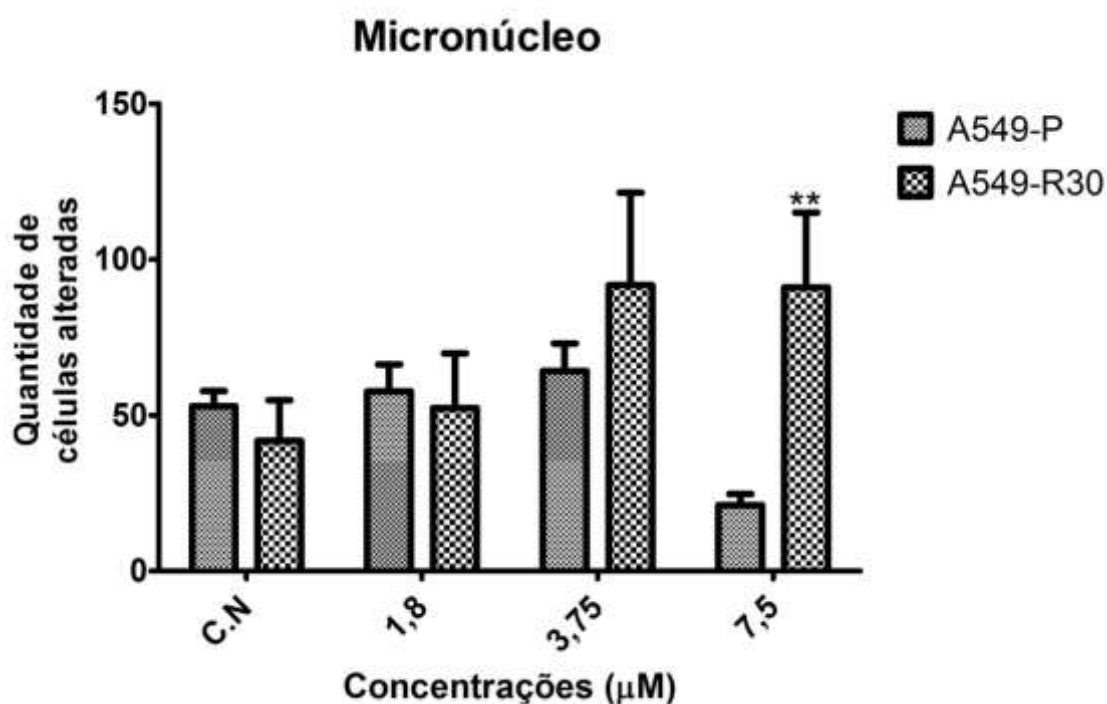


Fonte: Do autor.

Legenda: Nota-se um perfil de biomarcadores diferente entre as linhagens A549-P e A549-R30 para cada um dos tratamentos aqui apresentados (Controle Negativo, 1,8, 3,75, 7,5 μ M de Cisplatina). MN = micronúcleo; B = Broto; P = Ponte; MN + B = micronúcleo + broto; MN + P = micronúcleo + ponte; B + P = broto + ponte; MN + B + P = micronúcleo + broto + ponte. Valores expressos da média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por test t Student pareado. $p = <0,05$.

Como mostra a Figura 13, as células A549-R30 apresentaram uma quantidade de micronúcleos (MNs) significativamente superior às células A549-P, quando expostas a 7,5 μM de cisplatina (91 ± 41 vs. 21 ± 8 , respectivamente), sendo que doses menores não causaram nenhuma mudança na quantidade deste biomarcador. Este resultado sugere que células resistentes apresentam um limiar mínimo de resposta celular onde o estresse terapêutico (dosagem de 7,5 μM) determina um incremento na formação de MNs nas células CPCNP resistentes a cisplatina, evento que poderia estar relacionado com a aquisição de quimiorresistência.

Figura 13 - Quantidade de células contendo micronúcleos.



Fonte: Do autor.

Nota: Diferente padrão de presença de micronúcleos entre células das linhagens A549-P e A549-R30 para cada um dos tratamentos aqui apresentados (Controle Negativo, 1,8, 3,75, 7,5 μM de cisplatina). Valores expressos da média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por test t Student pareado. $p = <0,05$.

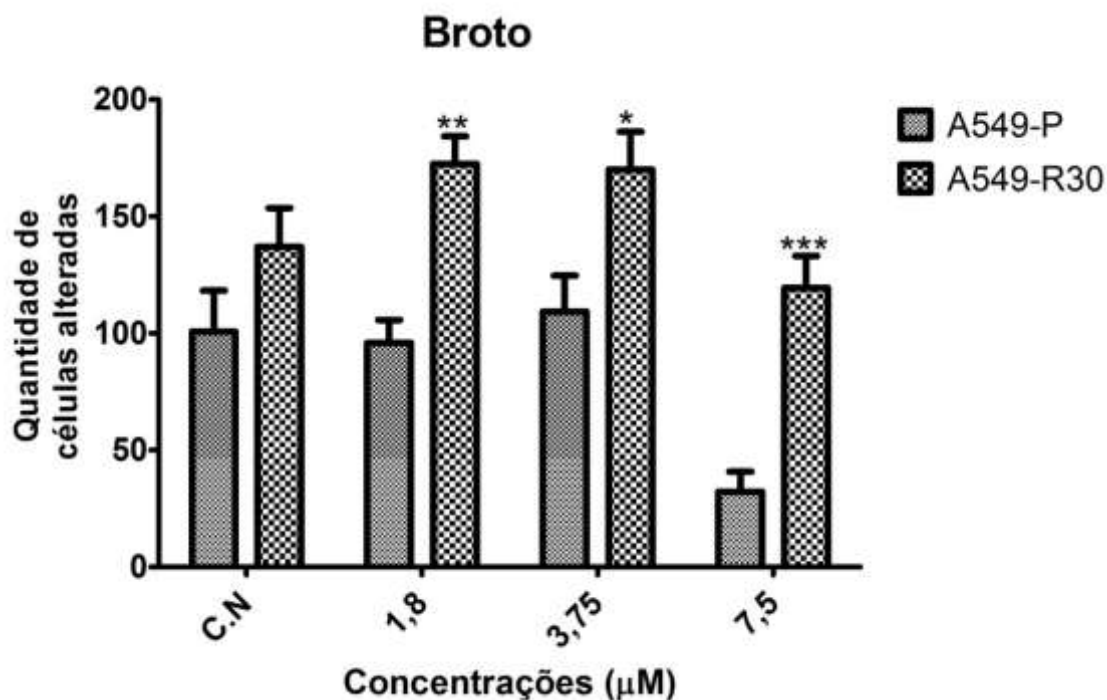
Apesar de que os mecanismos de formação de MNs não sejam completamente conhecidos, a presença de MNs em células tumorais é indicativa de instabilidade genômica geral e de mudanças no genoma, devido principalmente a seu conteúdo de cromossomos inteiros, fragmentos cromossômicos ou combinações dos mesmos (HENG *et al*, 2013). De acordo

com Ye e colaboradores (2019), o caos genômico causado por situações de estresse microambiental, tal como o que acontece em tratamentos quimioterápicos, promove uma reorganização rápida e massiva do genoma que contribui significativamente na evolução pontuada do câncer. Dentre os subtipos de caos genômico, a cromotripsis, tem chamado muito a atenção científica por ser um único evento catastrófico que acontece após o dano do DNA e envolve a formação de até milhares de rearranjos cromossômicos que podem ser reintegrados ao genoma, resultando em rearranjos cromossômicos localizados e mais complexos.

Recentemente, foi estabelecido um modelo pelo qual o MN contribui na formação de novos genomas por meio de: (1) geração de cromotripsis, induzida principalmente pela ação de drogas, e associado com a formação de brotos nucleares e células gigantes, e relacionada intimamente com aneuploidia; (2) alteração de composição cromossômica e introdução de cromossomos translocados; e (3) incorporação de mecanismos moleculares altamente diversos gerando novos sistemas genômicos e reorganização do genoma, especialmente os envolvidos com instabilidade cromossômica (CIN) (YE *et al.*, 2019; SOMMER *et al.*, 2020).

Concordante com estas informações, nossos ensaios CBMN-cit mostraram uma maior quantidade de brotos nucleares (B) observados nas células A549-R30 em todos os tratamentos de cisplatina testados, quando comparadas a sua contraparte parental A549-P (Figura 14). Recentemente, MNs têm sido relacionados a anormalidades nucleares que envolvem formação de brotos e transferência genômica horizontal como resposta a estresse terapêutico (MIRZAYANS *et al.*, 2018). Nesse contexto, células gigantes com um conteúdo nuclear elevado deixam de proliferar ou proliferam muito lentamente (como observado no nosso estudo). No entanto, estas células secretam fatores de crescimento promovendo um perfil estaminal e quimiorresistente por meio de: (1) formação de brotos nucleares ou “explosões” nucleares, semelhante a organismos simples como fungos; (2) despoliploidização; e (3) transmissão horizontal de um “sub-genoma” entre as células (MIRZAYANS *et al.*, 2018).

Figura 14 - Quantidade de células contendo brotos.



Fonte: Do autor.

Nota: Diferente padrão de presença de brotos entre células das linhagens A549-P e A549-R30 para cada um dos tratamentos aqui apresentados (Controle Negativo, 1,8, 3,75, 7,5µM de cisplatina). Valores expressos da média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por test t Student pareado. $p < 0,05$.

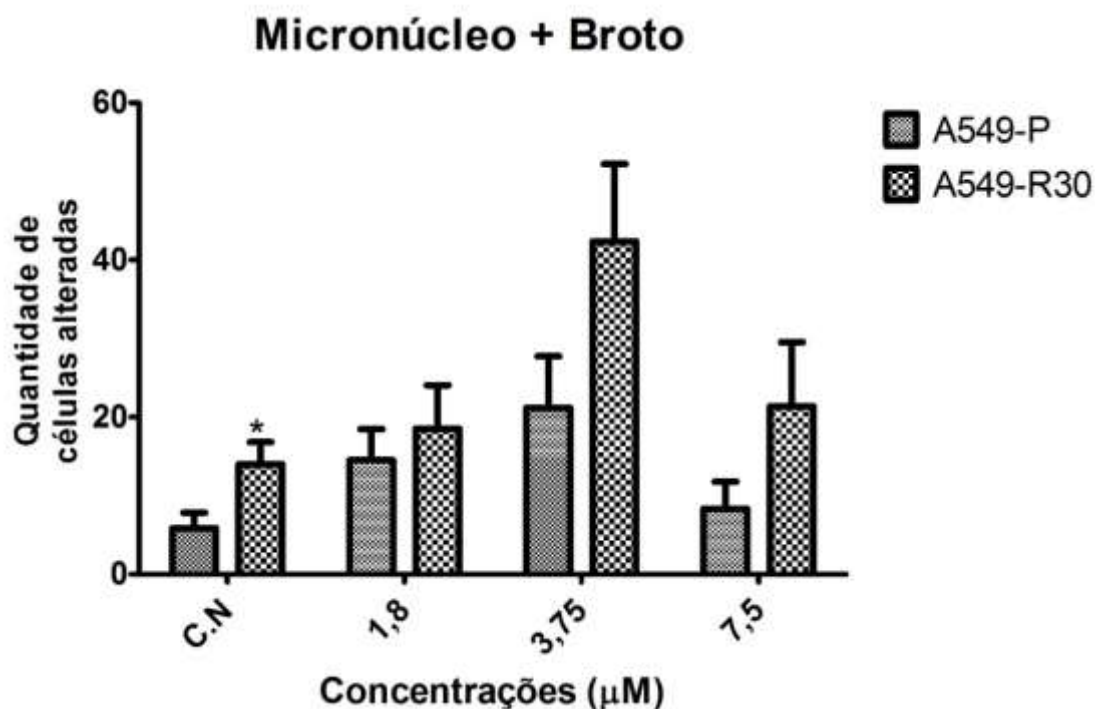
Assim, no nosso estudo, o significativo aumento de brotos nucleares (observado nas Figuras 12 e 14) pode representar uma resposta adaptativa ao processo de quimiorresistência já estabelecido nas células A549-R30 e que, vantajosamente, poderia acelerar o processo de evolução cromossômica e tumoral. Esta hipótese resulta concordante com o proposto por Puig e colaboradores, que no ano 2008, caracterizaram o papel de células cancerosas gigantes poliploides na resposta terapêutica à cisplatina. Desde então, vários grupos têm confirmado que células cancerosas gigantes multinucleadas/poliploides podem iniciar a formação de tumores resistentes à terapia, via processos de deploidização ou brotamento nuclear (MIRZAYANS *et al.*, 2018).

Adicionalmente, e de maneira controversa, o ensaio de CBMN-cit mostrou uma quantidade inferior de pontes nucleoplasmáticas (P) nas células resistentes A549-R30 quando comparadas às parentais A549-P, e quando ambas não foram expostas a cisplatina ou quando foram tratadas com 1,8 µM de cisplatina. Por outro lado, não houve diferenças significativas quando ambas as células foram

tratadas com 3,75 ou 7,5 μM de cisplatina. Estes resultados, somados aos altos desvios padrão obtidos nessa contagem, reforçam a necessidade de aumentar o número de repetições/ensaios para refinar e aprimorar os dados obtidos e interpretar melhor os possíveis mecanismos envolvidos.

É interessante notar o aumento na quantidade de células que apresentam micronúcleo (MN) e broto (B) (Figura 15). Resultados semelhantes foram encontrados por Kokenek-Unal e Coban (2017), ao avaliarem a frequência de micronúcleo, broto e NP (protusões nucleares, do inglês: *nuclear protusions*) em células de esfregaços de aspiração da tireoide. Para os autores, a presença de NP (micronúcleo + broto) estava relacionado a um perfil mais maligno por parte das amostras avaliadas.

Figura 15 - Quantidade de células contendo micronúcleo + broto



Fonte: Do autor.

Legenda: Diferente padrão de presença de micronúcleos + brotos entre células das linhagens A549-P e A549-R30 para cada um dos tratamentos aqui apresentados (Controle Negativo, 1,8, 3,75, 7,5 μM de cisplatina). Valores expressos da média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por test t Student pareado. $p = <0,05$.

Usando sondas centroméricas e teloméricas, Lindbergh e colaboradores (2007) verificaram que micronúcleo e o broto possuem diferentes mecanismos de origem, sendo que os brotos parecem ser formados com mais DNA intersticial sem centrômero ou telômero. Os brotos nucleares são observados em culturas

cujo crescimento se dá sobre condições fortemente seletivas, com indução da amplificação gênica (FENECH *et al.*, 2011). Isso corrobora com os achados de aumento na quantidade de brotos na linhagem resistente A549-R30, como discutido anteriormente.

Em 2017, El-Zein e colaboradores avaliaram o sangue periférico de pacientes com câncer de pulmão em estágios iniciais por meio do ensaio de citoma micronúcleo. A amostra continha grupos com CPCP e CPCNP. Os autores verificaram, então, quais cromossomos poderiam influenciar a presença de micronúcleo, ponte e broto em cada um desses grupos. Constataram, assim, que para o CPCNP, os cromossomos 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22 e X têm forte influência sobre a presença de micronúcleo nas células, o que está ligado à perda cromossômica ou aneuploidia. Para a formação de pontes, o que reflete os rearranjos cromossômicos, os cromossomos 1, 2, 3, 4, 9, 11, 14, 17, 19 e X são os que aparecem responsáveis pela presença desse biomarcador. Por último, ao se avaliar o nível de amplificação gênica, representada pelos brotos nucleares presentes nas células de pacientes com CPCNP, verificou-se que os cromossomos 2, 4, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 20 e 21 são aqueles que contribuem para a presença do biomarcador. Nesse último caso, a frequência dos cromossomos 4, 9, 11, 15 e 17 somam 67% do total de brotos avaliados.

A amplificação gênica leva à expressão aumentada de oncogenes e, assim, a um aumento no risco de câncer. Esse mesmo mecanismo pode ser responsável pela rápida evolução tumoral e pelo desenvolvimento do perfil resistente frequentemente visto em cânceres (SIDDIK, 2006).

A Tabela 1 apresenta os valores numéricos para cada um dos biomarcadores encontrados em cada um dos tratamentos analisados.

Tabela 1: Quantidade de Biomarcadores de instabilidade encontrados em cada tratamento, em cada uma das linhagens

(continua)

Tipos de Biomarcadores	Controle		1,8 μ M				3,75 μ M				7,5 μ M					
	A549-P		A549-R30		A549-P		A549-R30		A549-P		A549-R30		A549-P		A549-R30	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
MN	52,83	\pm 12,02	41,75	\pm 26,15	57,67	\pm 21,19	52,25	\pm 35,12	64,17	\pm 21,64	91,67	\pm 51,42	21,17	\pm 8,59	91,00**	\pm 41,58
B	100,67	\pm 43,01	137,00	\pm 33,17	95,83	\pm 24,17	172,50**	\pm 23,52	109,17	\pm 37,98	170,00	\pm28,16*	32,17	\pm 21,07	119,33***	\pm 23,86

Tabela 2: Quantidade de Biomarcadores de instabilidade encontrados em cada tratamento, em cada uma das linhagens

(conclusão)

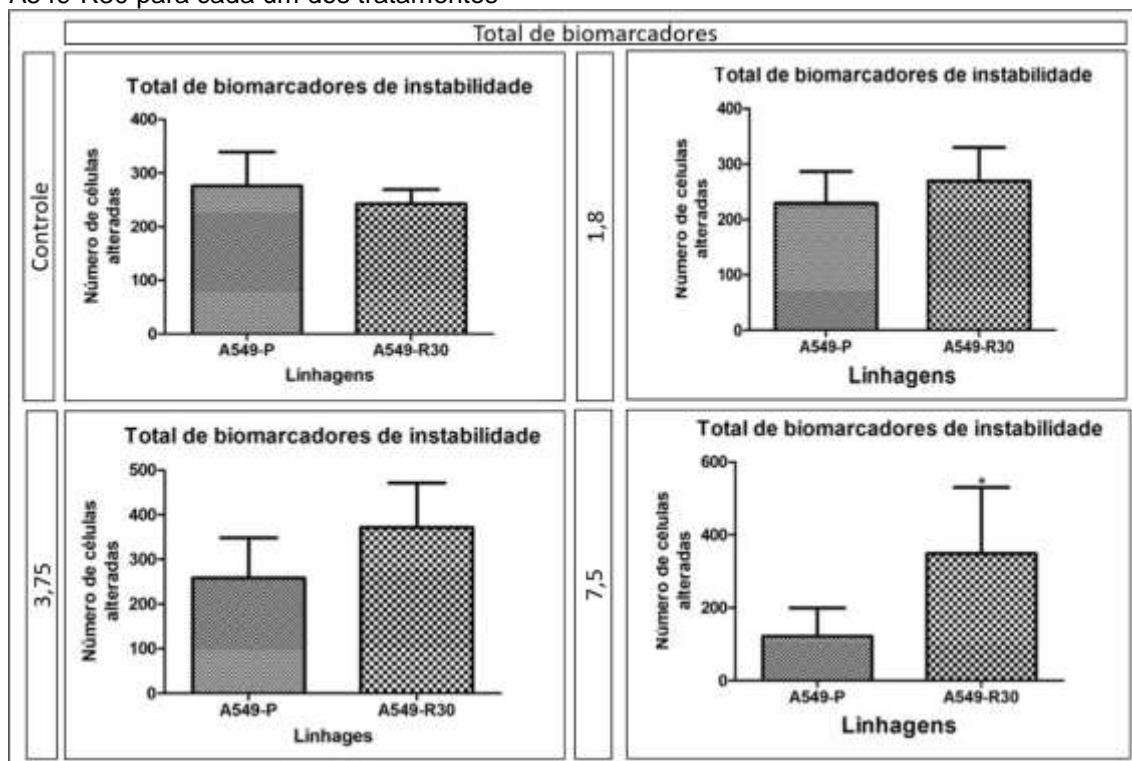
Tipos de Biomarcadores	Controle		1,8 μ M				3,75 μ M				7,5 μ M					
	A549-P		A549-R30		A549-P		A549-R30		A549-P		A549-R30		A549-P		A549-R30	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
P	83,83	\pm 31,95	31,00*	\pm 14,90	33,83	\pm 8,38	18,50*	\pm 12,48	39,33	\pm 14,26	35,33	\pm 20,21	35,50	\pm 27,82	91,33	\pm 110,15
MN + B	5,83	\pm 4,92	14,00*	\pm 5,60	14,50	\pm 9,75	18,50	\pm 11,12	21,17	\pm 16,04	42,33	\pm 17,1	8,33	\pm 8,43	21,33	\pm 14,19
MN + P	2,50	\pm 1,64	2,75	\pm 2,99	5,67	\pm 3,26	1,75	\pm 3,50	6,50	\pm 4,59	7,67	\pm 1,53	5,50	\pm 5,17	8,00	\pm 10,39
B + P	4,50	\pm 2,59	3,75	\pm 2,63	3,50	\pm 2,26	1,00	\pm 2,00	3,17	\pm 1,72	6,33	\pm 3,21	2,50	\pm 2,17	7,00	\pm 5,20
MN + B + P	0,50	\pm 1,22	1,50	\pm 1,73	1,00	\pm 1,55	1,00	\pm 2,00	1,50	\pm 2,07	4,33	\pm 2,89	1,50	\pm 2,26	2,33	\pm 3,21
Apoptose	25,33	\pm 17,87	11,00	\pm 9,87	17,33	\pm 10,67	4,00*	\pm 3,56	13,50	\pm 10,43	14,33	\pm 11,24	15,00	\pm 22,65	8,33	\pm 8,02

Fonte: Do autor.

Legenda: MN = Micronúcleo; B = Broto; P = Ponte; MN + B = Micronúcleo + Broto; MN + P = Micronúcleo + Ponte; B + P = Broto + Ponte; MN + B + P = Micronúcleo + Broto + Ponte. Valores expressos da média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por test t Student pareado. p = <0,05

O total de biomarcadores para cada linhagem em cada tratamento também foi avaliado (Figura 16). É possível notar um aumento do número de células alteradas conforme ocorre o aumento do tratamento com cisplatina, o qual se torna estatisticamente significativo na concentração de 7,5 μ M de cisplatina.

Figura 56 - Comparação do total de células com anormalidades entre as linhagens A549-P e A549-R30 para cada um dos tratamentos



Fonte: Do autor.

Nota: Nota-se um aumento do total de anormalidades na linhagem resistente à medida que se aumenta a concentração de tratamento com a cisplatina. Valores expressos da média mais ou menos desvio padrão da média, e analisados por test t Student pareado. $p = <0,05$.

O ensaio de micronúcleo é um ensaio bem estabelecido, cujo valor se aplica tanto à indústria, quanto à pesquisa acadêmica. A simplicidade da contagem de MN e a ampla aplicabilidade do ensaio em diferentes tipos de célula o torna uma ferramenta atrativa para avaliar anormalidades citogenéticas. Lesões em nível do DNA ou dos cromossomos, bem como alterações nas proteínas direta ou indiretamente envolvidas na segregação dos cromossomos são os mecanismos responsáveis pela indução e formação do micronúcleo. O último mecanismo, que é definido como aneuploidia, induz a uma desordem no número de cromossomos pela interferência na maquinaria de divisão celular (HASHIMOTO *et al.*, 2012).

Curiosamente, os danos de DNA causados pela platinação após o tratamento com cisplatina deveriam ou parar o ciclo celular ou levar à morte celular, aqui as células resistentes – após se recuperarem do período de tratamento – apresentaram, ainda que o IDN seja parecido com sua contraparte

parental, maior quantidade de células em divisão, tendo uma redução de 20% a 40% no número de células mononucleadas (dados não apresentados).

Como proposto por Cepeda e colaboradores (2007), o mecanismo de resistência à cisplatina é considerado um fenômeno multifatorial, que pode ocorrer devido à acumulação reduzida da droga, à inativação das espécies contendo tiol, aumento de reparo de adutos de DNA-platina e falha nas vias de morte celular. Esses mecanismos de resistência são célula-dependente e varia de tumor para tumor, exibindo um, ou dois, ou até mesmo todos os mecanismos descritos.

Mais estudos poderiam ser feitos a fim de se avaliar quais mecanismos moleculares estão presentes na aquisição de resistência da linhagem A549 quando tratada com doses constantes de cisplatina. A fim de avaliar a influência do regime de tratamento a dose de IC50 sobre o perfil citogenético das linhagens A549-P e A549-R30, o ensaio de citogenética foi realizado.

6. 7 O perfil citogenético da linhagem resistente apresenta-se mais homogêneo em relação ao perfil da linhagem parental

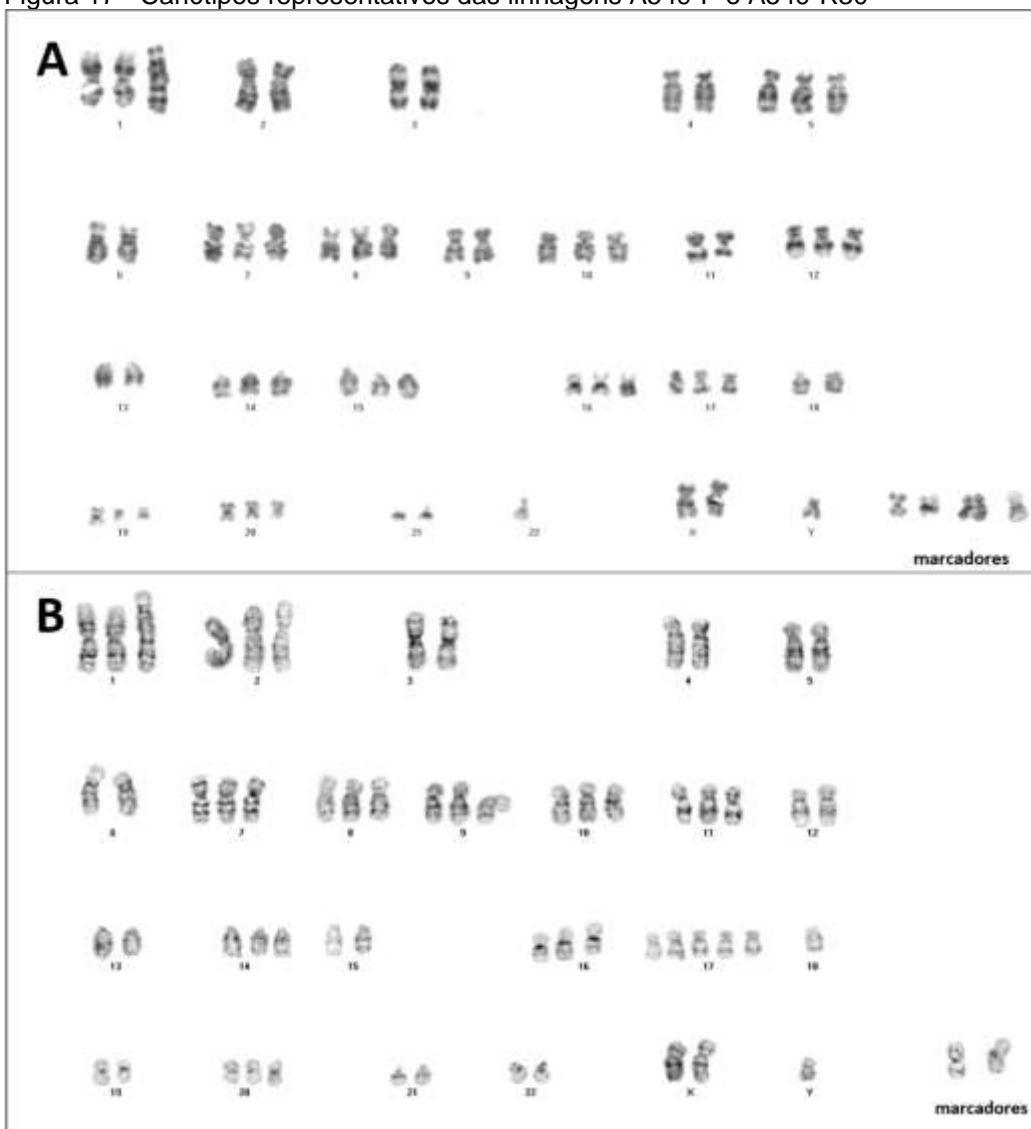
Como já proposto anteriormente por diversos autores (NEGRINI *et al.*, 2010; HUGHES; ANDERSSON, 2015; YAKISICH *et al.*, 2017; VON LOGA e GERLINGER, 2017; GRONROS; LÓPEZ-GARCÍA, 2018), a heterogeneidade tumoral é uma característica do câncer e está relacionada ao processo de quimiorresistência, dessa forma a análise do perfil cariotípico da linhagem resistente comparada ao da linhagem parental pode trazer luz acerca dos mecanismos envolvidos no processo de aquisição de resistência.

Aqui, as metáfases de ambas as linhagens foram analisadas após bandeamento GTG (Figura 17). A fórmula cromossômica final da linhagem A549-P foi 53~66, XXY, -X [3], -Y[4], t(1;6)(p21;q22)[20], -1[3], -2[19], -3[20], -4[20], -5 [3], -6[12], -6[6], del(6)(p23-pter)[3], -8[4], -9[7], -9[5], -10[4], -11[10], del(11)(q23-qter)[10], -12[5], -13[16], -14[8], -15[9], +15[2], -16[7], +17[10], -18[15], -19[12], -20[13], -21[14], -22[16], + mar1[21], +mar2[21], +mar3[15], +mar4[11], +mar5[4], +mar6[2][cp21], enquanto a fórmula cromossômica final da linhagem resistente

A549-R30 foi 58~64, XXY, t(1;6)(p21;q22)[25], -2[23], -3[22], -4[21], -5[9], -6[23], del(6)(pter)[14], -7[4], -8[10], -9[7], -11[11], del(11)(q23-qter)[4], +11[3], -12[11], -13[19], -14[5], -15[10], +16[6], +17[12], +17[12], -18[19], -18[3], -19[13], -20[13], -21[23], -22[20], +mar1[25], +mar2[20], +mar3[4] +mar4[1] [cp25]. Cariótipos representativos das linhagens podem ser vistas na Figura 15. As Figuras 18 e 19 (referentes às populações celulares de A549-P e A549-R30, respectivamente) mostram o padrão de metáfases encontrado em cada linhagem. No eixo X, encontram-se plotados cada um dos 22 cromossomos da espécie humana, bem como os cromossomos sexuais e possíveis marcadores encontrados nas linhagens. No eixo Y, encontra-se o número de cópias encontrado para cada um dos cromossomos e parâmetros analisados. Já no eixo Z (profundidade), estão enumeradas cada uma das metáfases avaliadas. A descrição de cada uma das metáfases pode ser encontrada nos apêndices A e B, referentes à linhagem parental e linhagem resistente, respectivamente.

Para a interpretação dos gráficos é preciso levar em consideração a característica clonal e não-clonal de cada um dos parâmetros observados. Uma característica clonal é aquela que se repete em mais de 3 figuras mitóticas analisadas, enquanto as não-clonais são aquelas que ficam abaixo de 2 figuras mitóticas analisadas (RANGEL *et al.*, 2017). Conforme as características se sobrepõem, é formado uma linha contínua no eixo Z, quanto mais contínua essa linha, mais clonal é a característica observada. Um exemplo é a trissomia do cromossomo 1 presente nas células da linhagem A549-P. Como pode ser visto na Figura 16, essa característica forma uma linha contínua que atravessa todo o eixo Z, indicando que esse é um parâmetro clonal para as células parentais.

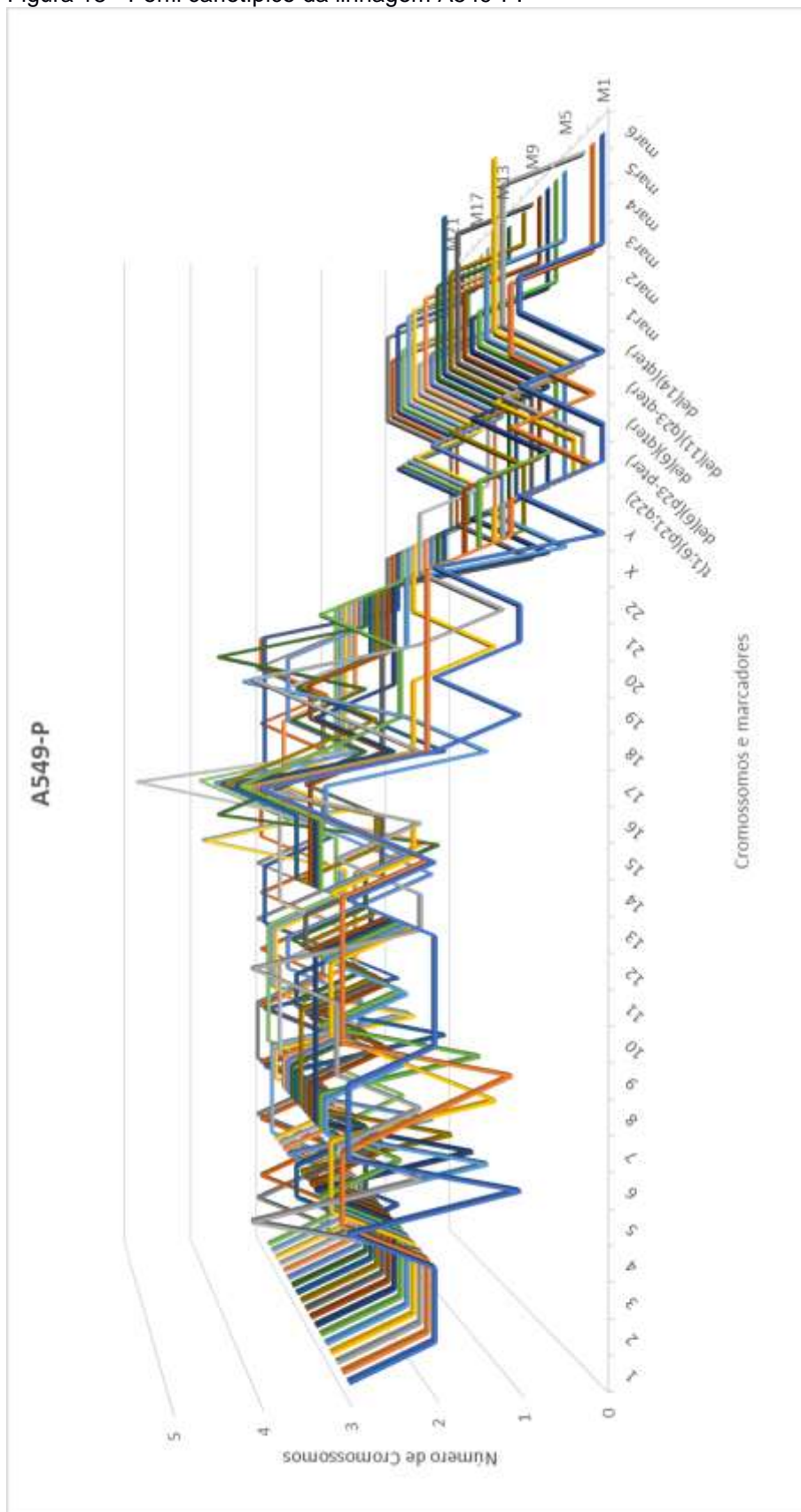
Figura 17 - Cariótipos representativos das linhagens A549-P e A549-R30



Fonte: Do autor.

Legenda: A) Cariótipo de uma célula da linhagem A549-P; B) Figura mitótica representativa da linhagem A549-R30.

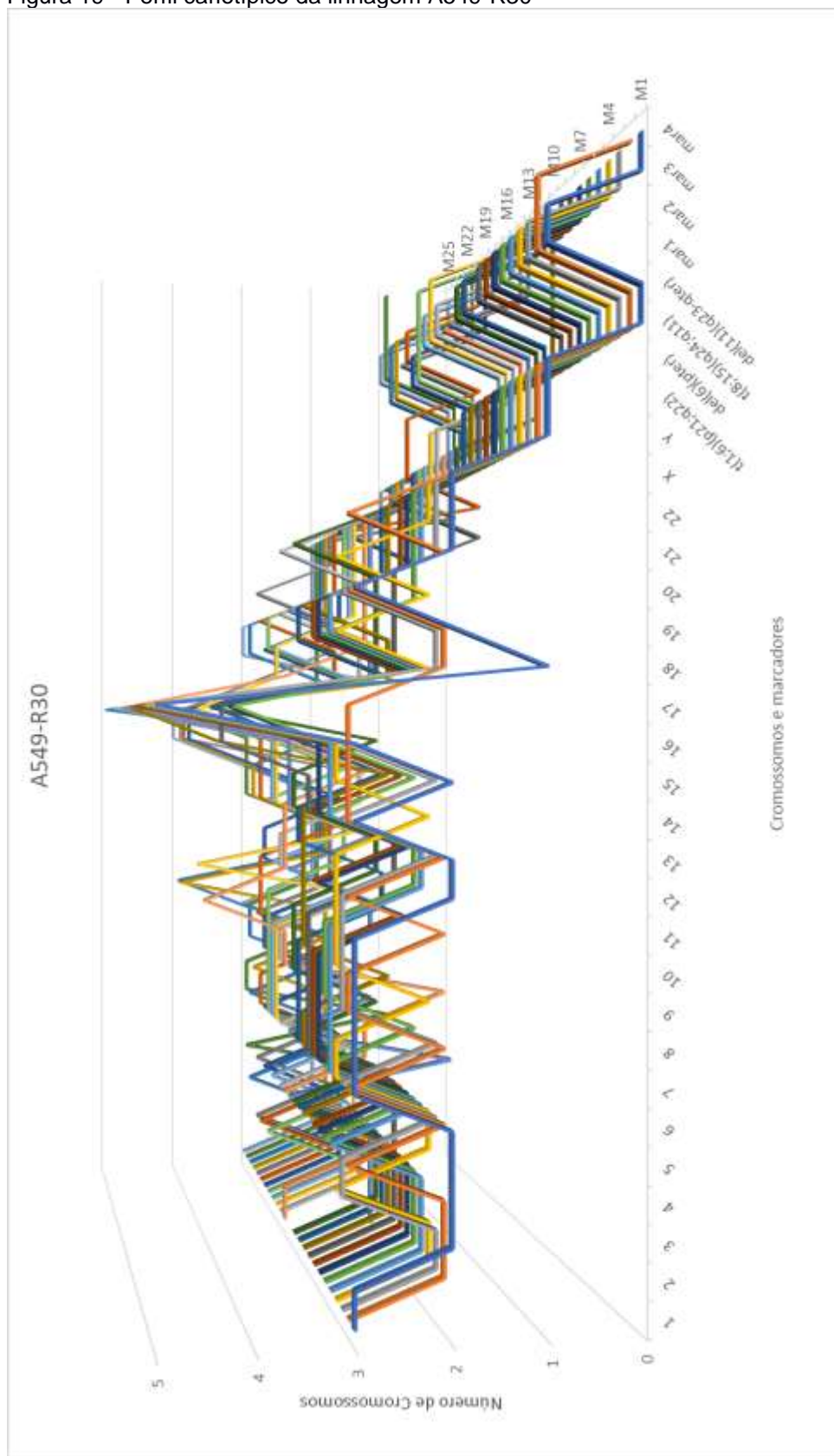
Figura 18 - Perfil cariotípico da linhagem A549-P.



Fonte: Do autor.

Nota: A heterogeneidade tumoral é evidente na população celular tendo em vista a quantidade de cromossomos e marcadores presente em cada metáfase analisada.

Figura 19 - Perfil cariotípico da linhagem A549-R30



Fonte: Do autor.

Nota: A heterogeneidade tumoral é menos evidente na população celular levando-se em consideração a quantidade de cromossomos e marcadores presente em cada metáfase analisada.

Curiosamente, não foram encontradas metáfases que apresentassem o mesmo perfil cariotípico, logo a heterogeneidade tumoral é uma marca presente na linhagem A549 parental, proposição essa que é corroborada pelo índice de alterações não clonais, correspondendo a 12 alterações na linhagem parental, contra 6 na linhagem resistente. Quanto às alterações clonais, a frequência também se mostrou diferente entre os cariótipos: 41 alterações na linhagem A549-P e 34 na linhagem A549-R30 (Tabela 2).

Tabela 3 - Diferença Cariotípica entre as linhagens A549-P e A549-R30

Linhagens	A549-P	A549-R30
Média nº Cromossômico	60,58 ± 2,78	61,24 ± 2,16
Total de CCAs	41	34
Perda de CCAs vs A549-P	-	9
Ganhos de CCAs vs A549-P	-	3
Total de NCCAs	12	6
Frequência de NCCAs	57%	24%
NCCAs por célula	0-3	0-3

Fonte: Do autor.

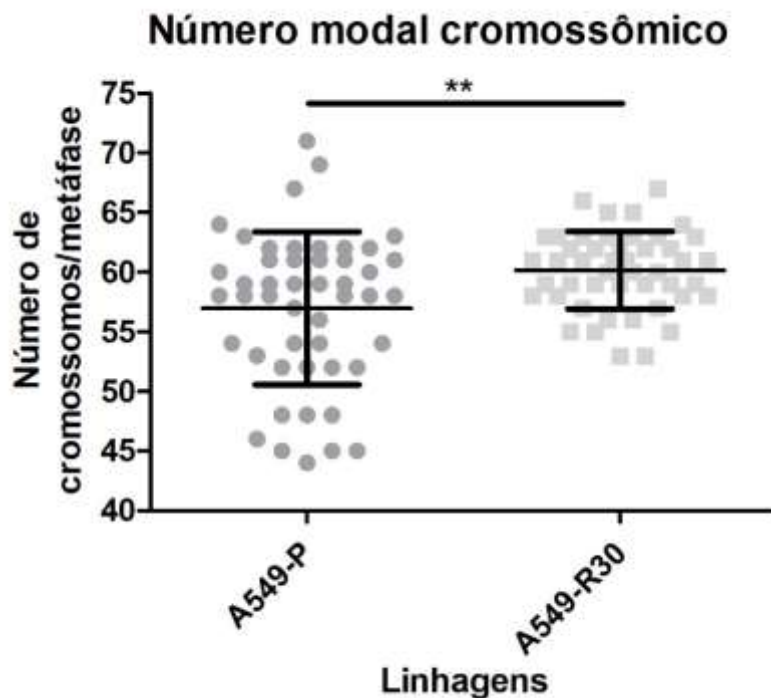
Legenda: CCAs: Alterações Cromossômicas Clonais; NCCAs: Alteração Cromossômicas Não-Clonais.

No que se refere à linhagem resistente, as células A549-R30 se mostraram mais homogêneas, ainda que nenhum perfil cariotípico tenha se repetido durante a análise das metáfases (Apêndice B). Contudo, para essa linhagem a característica clonal de cada um dos parâmetros observados está mais evidente (Figura 19), o que mostra possível seleção de linhagens cujo perfil cariotípico é vantajoso para a crescimento celular e manutenção da resistência.

Várias foram as diferenças encontradas entre as figuras mitóticas observadas da linhagem parental e as figuras mitóticas observadas da linhagem resistente. O número cromossômico médio também foi avaliado a partir da observação de 50 metáfases sem bandeamento GTG. Desse modo, para a linhagem A549-P foi observada uma média de $56,96 \pm 0,9244$ cromossomos por metáfases e para linhagem A549-R30 foi observada uma média de $60,15 \pm$

0,4741 cromossomos por metáfases. A distribuição do número de cromossomos pode ser vista na Figura 20.

Figura 206: Número de cromossomos distribuídos por metáfases para linhagem parental e resistente



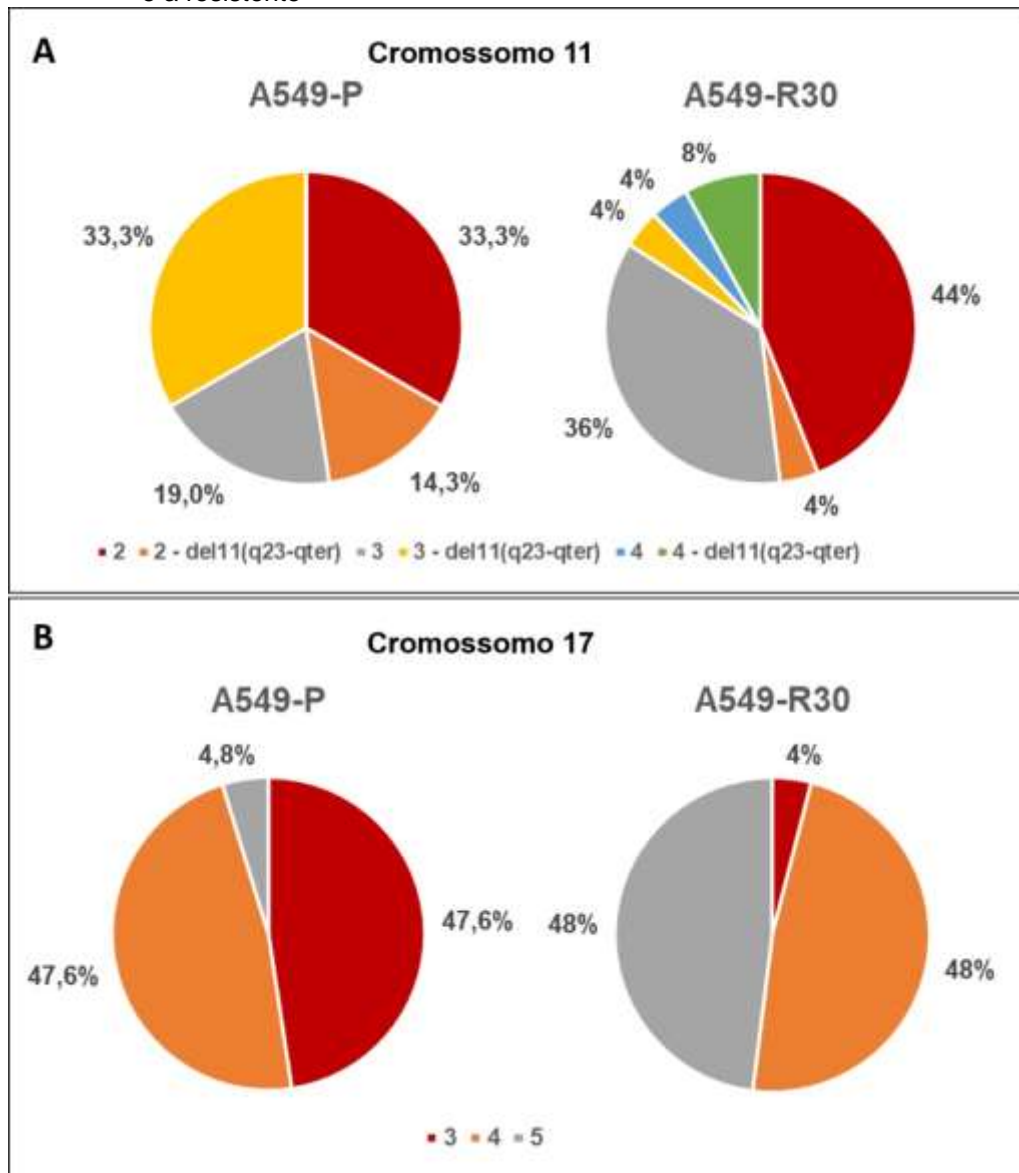
Fonte: Do autor.

Nota: A distribuição dos cromossomos entre as metáfases da linhagem resistente é mais homogênea. Os círculos ou quadrados representam valores individuais e as linhas horizontais (melhor fazer em outra cor) as médias de cada grupo com seus respectivos desvios padrão. Os dados foram analisados por teste t de Student não paramétrico. $p < 0,01$.

Além da mudança referente ao número cromossômico, outras alterações também ficaram evidentes. Exemplos de algumas alterações clonais (CCAs) e não clonais (NCCAs) podem ser vistas na Figura 19, que apresenta as mudanças clonais e que podem ser entendidas como exemplos de evolução cariotípica, para os cromossomos 11 e 17 e na quantidade de cromossomos marcadores por cada linhagem. Após a seleção clonal, é possível verificar uma diminuição no número de cópias de cromossomos 11 portadores de deleção terminal do braço longo [del(11)(q23-qter)], bem como o aumento da quantidade de cariótipos apresentando 5 cópias do cromossomo 17. Quanto aos cromossomos marcadores, aqueles sem identificação por conta da complexidade estrutural observada, a diversidade entre metáfases também foi relevante, com células A549-P chegando a ter 5-6 marcadores, frente aos 2-3 cromossomos

marcadores encontrados nas células A549-R30, refletindo assim, uma maior complexidade cariotípica da linhagem parental.

Figura 21 - Mudança na frequência e distribuição de CCAs e NCCAs entre a linhagem parental e a resistente



Fonte: Do autor.

Legenda: A) Mudança na frequência da quantidade de cromossomo 11 e del(11)(q23-qter) por metáfase após o tratamento com cisplatina. B) Mudança na frequência do número de cromossomo 17 por metáfase após o tratamento com cisplatina. Dados expressos em porcentagem.

É interessante ressaltar que a $t(1;6)(p21;q22)$ é um rearranjo estrutural clonal que esteve presente em todas as células analisadas, tanto na linhagem parental (A549-P), como na linhagem resistente (A549-R30). Translocações

entre os cromossomos 1 e 6 já foram encontradas por outros autores em células de CPCNP (LUK *et al.*, 2001; SPEICHER *et al.*, 2000; BERRIEMAN *et al.*, 2004). Embora os pontos de quebra cromossômicos não sejam os mesmos para todos os trabalhos, inclusive este, a presença dessa translocação ou do envolvimento desses 2 cromossomos em rearranjos estruturais, sua maquinaria de segregação, sua distribuição espacial 3D em núcleos interfásicos ou seus mecanismos de replicação, poderiam estar relacionados com o desenvolvimento de CPCNP.

Por outro lado, a CIN deve ser resultado de falhas em diferentes passos do ciclo de DNA, desde a replicação até a segregação. Entretanto, falha na replicação e na resposta de dano ao DNA são as causas mais comuns de instabilidade. Somado a isso, a variação genômica e a heterogeneidade genética são características universais do câncer. A maioria dos tumores apresentam aberrações cromossômicas de tal forma que não somente as mutações em genes individuais estão relacionadas à transformação das células normais em células cancerosas (AGUILERA; GARCÍA-MUSE, 2013; HENG *et al.*, 2006).

No início do século XXI, Duesberg e seus colaboradores (2001) afirmaram que a resistência adquirida é gerada por rearranjos cromossômicos que são catalisados por aneuploidia característica de células cancerosas. Essa hipótese prediz que o fenótipo quimiorresistente pode evoluir paulatinamente de uma simples combinação cromossômica acidental – que confere baixa quimiorresistência – a uma combinação complexa que confere à célula o fenótipo de alta resistência às drogas. É relevante salientar que esse mesmo mecanismo, de maneira reversa, pode tornar a célula menos resistente. Ainda é de importante relevância destacar que a quimiorresistência de células aneuploides é alcançada pela seleção de rearranjos cromossômicos. Esses rearranjos também podem explicar o fato de que uma célula resistente a uma determinada substância se torna também resistente a várias outras, uma vez que qualquer combinação cromossômica que é específica para uma determinada função é também específica para várias outras funções codificadas por genes formados aleatoriamente pelo rearranjo. Assim, uma célula multirresistente pode, além de tudo, ter também uma variação celular morfológica. Essa hipótese afirma ainda que uma célula normal, não transformada, não pode se tornar resistente por esse

mecanismo, já que aneuploidia e CIN não são compatíveis com a função normal, nem com o desenvolvimento, nem com a herança germinativa.

A CIN refere-se a uma maior propensão a erros de segregação cromossômica, resultando em aneuploidia e desequilíbrios genômicos. A própria aneuploidia pode promover a CIN, perturbando a estequiometria das proteínas envolvidas na segregação cromossômica, induzindo a erros durante a mitose e defeitos na replicação. Em geral, a maioria dos cânceres apresenta vários graus de instabilidade genômica, incluindo mutações pontuais, rearranjos cromossômicos e mudanças na ploidia da célula (POTAPOVA; GORBSKY, 2017).

O microambiente tumoral pode ser entendido como um ecossistema celular complexo que está constantemente evoluindo, respondendo a desafios tais como falta de oxigênio e de nutrientes, ataque do sistema imunológico e terapias. Dessa forma, as células transformadas devem se adaptar às mudanças em seu microambiente, tendo a aneuploidia como um fator facilitador da evolução tumoral. Vale lembrar que como consequência da instabilidade genômica, as células dentro de um tumor podem divergir e formar subpopulações distintas, resultando em heterogeneidade tumoral, que tem um papel importante na evolução tumoral e na resistência às drogas (POTAPOVA; GORBSKY, 2017; PENNER-GOEKE *et al.*, 2017).

Dessa forma, células cancerosas cromossomicamente instáveis tendem a desenvolver resistência a vários quimioterápicos. Prolongada exposição de células de câncer colorretal humano, por exemplo, a Irinotecano levou a seleção de células contendo uma cópia extra do cromossomo 14. Evidencia-se, assim, que as mudanças no microambiente tumoral causadas pelas drogas criam o nicho que permitem às células com constituição cromossômica alterada sobrevivência seletiva e vantagens de crescimento (POTAPOVA; GORBSKY, 2017; PENNER-GOEKE *et al.*, 2017).

No presente estudo foi identificado um evidente processo de seleção clonal e sobrevivência seletiva, no qual, algumas alterações cromossômicas inicialmente presentes na linhagem parental alteraram a sua frequência e se tornaram mais ou menos frequentes na linhagem resistente. Tal é o caso da deleção terminal do braço longo do cromossomo 11 [del(11)(q23-qter)], a qual foi identificada como alteração clonal em 8 de 17 das células A549-P analisadas

(47%) e apareceu significativamente diminuída para apenas 1 das 18 células A549-R30 analisadas (6%) (Figura 18).

Um dos primeiros trabalhos mostrando a importância da del(11)(q23-qter) foi feito no começo dos anos 1990. Nele, Satoh e colaboradores (1993) demonstraram que a introdução de 1 ou 2 cromossomos 11 nas células de CPCNP foi capaz de suprimir a tumorigenicidade das células. Logo, era evidente que essa porção do braço q do cromossomo 11 apresenta importantes genes com atividade de supressores de tumor. A relevância da região 11q23 foi apontada ainda por Lizula e colaboradores (1995), que demonstraram que a perda de alelos nessa região estava relacionada a carcinomas cervicais e carcinomas de cólon, evidenciando mais uma vez a presença de um gene supressor tumoral, cuja inativação está envolvida em vários tipos de câncer.

O gene *TSLC1/IGSF4*, cujo locus gênico é cromossomo 11q23.3, codifica uma molécula de adesão celular de superfamília de imunoglobulina (IgCAM), que é uma proteína de membrana envolvida nas interações célula-célula. As funções de várias moléculas de adesão são alteradas ou afetadas durante o processo de invasão e metástase de cânceres humanos. Como uma molécula de adesão celular entre células epiteliais, *TSLC1/IGSF4* age como um supressor de tumor em uma ampla variedade de cânceres de origem epitelial. A regulação negativa de *TSLC1* é frequentemente detectada em vários tumores humanos, incluindo CPCNP, câncer de próstata, carcinoma hepatocelular e cânceres pancreáticos. Além disso, sua baixa expressão está ligada a um diagnóstico ruim de pacientes com câncer esofágico (HIROHASHI; KANAI, 2003; KURAMOCHI *et al.*, 2004; MURAKAMI, 2005; ANDO *et al.*, 2008; De ZENG *et al.*, 2016).

Tudo isso mostra que a região deletada do cromossomo 11 é responsável pela manutenção da tumorigenicidade da linhagem parental. Uma vez que nessa região há a presença de um supressor tumoral tão importante para o processo de tumorigenicidade como o exemplificado anteriormente, é possível inferir que nas células resistentes a inativação desse gene por meio da deleção já não é relevante para a população celular, em vista que a população celular encontra-se num processo de transformação dinâmica e seleção de células cujos mecanismos de sobrevivência após o tratamento com cisplatina sejam mais eficazes do que a função do gene iniciador *TSLC1/IGSF4*, por exemplo. Mais estudos deverão ser feitos para verificar o nível de expressão de supressores

tumorais nas células resistentes, por ora é possível dizer que outras características da linhagem A549-R30 foram selecionadas, com por exemplo o aumento no número de cópias do cromossomo 17.

Como descrito inicialmente, o número de cópias do cromossomo 17 aumentou após a evolução cariotípica observada. Na linhagem parental A549-P é possível identificar 10 células com tetrassomia do cromossomo 17 (47,6% das células) e 1 célula com pentassomia do mesmo cromossomo (4,8% das células). Por outro lado, na linhagem resistente A549-R30 foram identificadas 12 células com pentassomia do cromossomo 17, representando 48% de todas as células analisadas..

O cromossomo 17 tem um alto conteúdo de guanina e citosina e muitas regiões com importantes genes, entre eles aqueles associados ao câncer de mama, incluindo os oncogenes HER2, TOP2A (DNA topoisomerase II alfa) e TAU (proteína associado ao microtúbulo), os supressores de tumor p53, BRCA1 e HIC-1, bem como o gene de reparo de dupla fita do DNA – RDM1. Assim, alterações do cromossomo 17 desempenham papéis importantes na tumorigênese (ZHANG; YU, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Vale lembrar, que entre os fatores mais importantes de crescimento e proliferação celular estão os receptores tirosina cinases da família ERBB, que são codificados pelos genes do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, 7p12), ERBB2 (HER2, 17q12), ERBB3 (12q13) e ERBB4 (2q33.3), sendo a proteína EGFR superexpressa na maioria dos carcinomas de pulmão (VARELLA-GARCIA, 2009).

Outro gene inserido no cromossomo 17 que está relacionado ao câncer é o gene *NF1*, responsável pela herança dominante relacionada a Neurofibromatose 1 (NF1). O gene *NF1* codifica para uma proteína supressora tumoral chamada neurofibromina, que ativa RAS-GTPase que inibe a via de sinalização Ras e interage com muitas outras proteínas (LEPPÄVIRTA *et al.*, 2018).

Um estudo com câncer gástrico feito por Ciesielski e colaboradores (2015) demonstrou que a polissomia do 17 ocorreu mais frequentemente em tumores presente na junção gastroesofageal versus aqueles localizados em outras partes do estômago. A polissomia também foi encontrada em pacientes com ressecção paliativa e em pacientes com presença de metástases distantes. Além disso,

complicações pós-operatórias estavam significativamente relacionadas ao grupo de pacientes com presença de polissomia do cromossomo 17.

Tudo isso confere ao cromossomo 17 um papel fundamental na manutenção da integridade das células tumorais e na sua consequente seleção clonal. Seja devido à presença de *TP53*, seja devido à presença de oncogenes como *HER2*, esse cromossomo é importante para vários tipos de cânceres, incluindo câncer de mama e gástrico. Aqui, na linhagem de CPCNP, A549, a tetrassomia ou a pentassomia do cromossomo 17 na linhagem resistente pode ter conferido às células mecanismos para suportar não somente o choque pelo tratamento com cisplatina, mas também mecanismos que favorecessem seu crescimento e progressão, o que levou ao aumento da resistência.

Enquanto o fenótipo da CIN dá à célula a habilidade de continuamente remoldar o seu conteúdo genômico, permitindo uma adaptação às mudanças nas condições ambientais, a aneuploidia permite apenas uma vantagem temporária. Células predominantemente aneuploides dentro da massa tumoral são o resultado não somente dos erros mitóticos, mas também de um processo de seleção, isso porque: a) os tumores carregam traços cariotípicos dominantes pela maioria das células; b) diferentes tipos de tumores são caracterizados por diferentes traços cariotípicos, implicando que genes específicos nesses cromossomos exercem benefícios oncogênicos específicos daquele tecido; e c) o aumento nos níveis de aneuploidia é geralmente correlacionado estágios tardios do tumor, sugerindo que vários ciclos de seleção acumulam mudanças cariotípicas diferentes durante a evolução tumoral (VAN JAARSVELD; KOPS, 2016).

Dessa forma, uma vez que agentes terapêuticos, como a cisplatina, podem ser considerados agentes de seleção presentes no microambiente tumoral, CIN e aneuploidia devem influenciar diferentemente a resposta à terapia, bem como as recidivas tumorais. Ambas, a aneuploidia e a CIN podem gerar resistência à terapia por meio de mecanismos evolucionários. Mas enquanto as populações aneuploides carregam clones com resistência intrínseca, as células que apresentam CIN têm maior plasticidade e devem assim desenvolver resistência adquirida e, conseqüentemente, podem estar relacionadas à recidiva tumoral (VAN JAARSVELD; KOPS, 2016). Neste trabalho, fica evidente que a CIN presente na linhagem parental, associada à

sua heterogeneidade tumoral, foi responsável pelo aparecimento e seleção de traços cariotípicos que favoreceram o crescimento da linhagem resistente.

7 CONCLUSÃO

A linhagem resistente foi estabelecida e após 3 ciclos de tratamento com cisplatina a resistência foi confirmada por meio do ensaio de proliferação. O ensaio de clonogenicidade confirmou o aumento de resistência da linhagem tratada, ainda que não tenha sido encontrada diferença significativa entre as linhagens analisadas. O ensaio de cicatrização de feridas confirmou o potencial migratório aumentado na linhagem resistente. Além disso, foi notada o aumento da quantidade de biomarcadores de instabilidade e a maior homogeneidade da população celular da linhagem A540-R30, quando comparada à sua linhagem parental A549-P. A análise dos biomarcadores sugeriu eventos de manutenção da instabilidade cromossômica e evolução genômica que poderiam explicar a geração da quimiorresistência das células de adenocarcinoma pulmonar. A análise das figuras mitóticas de cada linhagem permitiu verificar a mudança no padrão de aberrações cromossômicas apresentadas pela linhagem resistente em relação a linhagem parental. Tudo isso mostra que a aquisição de resistência está intimamente ligada ao nível de instabilidade cromossômica apresentada pela linhagem tumoral, bem como aos mecanismos de manutenção dessa instabilidade e, conseqüentemente, seleção das células com o fenótipo mais promissor para o crescimento da população celular.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, L. N.; CHOW, E. K. H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. **Clinical and Tralational Medicine**, v. 2, n. 3, 2013.
- AGUILERA, A.; GARCÍA-MUSE, T. Causes of genome instability. **Annual Review of Genetics**, v. 47, p. 1-32, 2013.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALLEN, K. E.; WEISS, G. J. Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 12, Dec. 2010.
- ALTHUBITI, M.; MACIP, S. Detection of senescent cells by extracellular markers using a flow cytometry-based approach. **Oncogene-Induced Senescence, Methods in Molecular Biology**. v. 1534, p. 147–153, 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is non-small cell lung cancer?** Atlanta, Georgia, 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/what-is-non-small-cell-lung-cancer.html>. Acesso em: 10 Jan 2020.
- ANDO, K. *et al.* Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 9, p. 2087-2094, Nov. 2008.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Guide to packaging and shipping of biological materials**. Manassas, 2020. Disponível em: <https://www.atcc.org>. Acesso em: 25 Jan 2020.
- BALLESTRERI, E. *et al.* Resistance mechanism to cisplatin in NCI-H460 non-small cell lung cancer cell line: investigating apoptosis, autophagy, and cytogenetic damage. **Cancer Drug Resistance**, v. 1, p 72-81. 2018.
- BARR, M. P. *et al.* Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, Jan. 2013.
- BACH, D. H. *et al.* Chromosomal instability in tumor initiation and development. **Cancer Research**, v. 79, 2019.
- BERRIEMAN, H. K. *et al.* Chromosomal analysis of non-small-cell lung cancer by multicolour fluorescent in situ hybridisation. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 900–905, 2004.

BOHLANDER, S. K.; KAKADIA, P. M. DNA repair and chromosomal translocations. **Chromosomal Instability in Cancer Cells**, v. 200, p. 1-37, 2015.

BORST, P. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what?. **Open biology**, v. 2, n. 5, p. 120066, 2012

CANINO, C.; CIOCE, M. Isolation of chemoresistant cell subpopulations. **Cancer Chemoprevention**, p. 139-150, 2016.

CASTRO-GAMERO, A. M. *et al.* Chromosomal heterogeneity and instability characterize pediatric medulloblastoma cell lines and affect neoplastic phenotype. **Cytotechnology**, v. 65, n. 5, p. 871-885, 2013.

CEPEDA, V. *et al.* Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 3-18, 2007.

CHEN, Z. *et al.* Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 8, p. 535-546, 2014.

CHOI, W. I. *et al.* Role of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) in cell proliferation and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21WAF/CDKN1A) gene repression. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 289, n. 27, 2014.

CIESIELSKI, M. *et al.* The HER2 Gene and HER2 Protein Status and Chromosome 17 Polysomy in Gastric Cancer Cells in Own Material. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 23, n. 2, p. 113–117, 2015.

CONERLISON, R.; LLANEZA, D. C.; LANDEN, C. N. Emerging therapeutics to overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer: a mini-review. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, vol.18, ed. 10, p. 2171, Oct. 2017.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, p. 364-378, Oct. 2014.

De ZENG, X. W. *et al.* Loss of CADM1/TSLC1 expression is associated with poor clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2016. 2016.

DIETRICH, M. F. e GERBER, D. E. Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. **Cancer Treatment Research**, v. 170, 2016.

DING-WU, S. *et al.* Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p.706-721, July 2012.

DU, B.; SHIM, J. S. targeting epithelial–mesenchymal transition (emt) to overcome drug resistance in cancer. **Molecules**, v. 21, n. 7. p. 965, July 2016.

DUESBERG, P. *et al.* Origin of multidrug resistance in cells with and without multidrug resistance genes: Chromosome reassortments catalyzed by aneuploidy. **Proceedings of the National Academy of the United States of America**, v. 98, n. 20, 2001.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v. 600, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, Jan. 2011.

FLEUR, L. L. *et al.* Mutation patterns in a population-based non-small cell lung cancer cohort and prognostic impact of concomitant mutations in KRAS and TP53 or STK11. **Lung Cancer**, v. 130, p. 50-58, 2019.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, Sept. 2012.

GAO, T. *et al.* In vitro effects of nicotine on the non-small-cell lung cancer line A549. **Journal Of Pakistan Medical Association**, v. 66, n. 4, Apr. 2016.

GIARD D. J.; *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, Nov. 1973.

GISSELSSON, D. *et al.* Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 1, p. 199-206, 2001.

GODEFRIDUS, J. P. Cancer drug resistance: a new perspective. **Cancer Drug Resistance**, v. 1, p.1-5, 2018.

GOMES, L. R. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition: implications in cancer progression and metastasis. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.12, n.11, p. 1881-1890, 2011.

GOODGAME, B. *et al.* Risk of recurrence of resected stage i non-small cell lung cancer in elderly patients as compared with younger patients. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 4, n. 11, p. 1370-1374, Nov. 2009.

GRIGOROVA, M. *et al.* Chromosome abnormalities in 10 lung cancer cell lines of the NCI-H series analyzed with spectral karyotyping. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 162, n. 1, p. 1-9, 2005.

GRONROOS, E.; LÓPEZ-GARCÍA, C. Tolerance of chromosomal instability in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. **American Association for Cancer Research**, v. 78, n. 23, 2018.

HOUSMAN, G. *et al.* Drug Resistance in Cancer: Na Overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769-1792, Sept. 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAIYAN, Z. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 1885-1895, 2016.

HANSFORD, S.; HUNTSMAN, D. G. boveri at 100: theodor boveri and genetic predisposition to cancer. **The Journal of Pathology**, v. 234, n. 2, p. 142-145, 2014

HASHIMOTO, K. *et al.* Difference in susceptibility to morphological changes in the nucleus to aneugens between p53-competent and p53-abrogated lymphoblastoid cell lines (TK6 and NH32 cells) in the in vitro micronucleus assay. **Mutagenesis**, v. 27, n. 3, May. 2012.

HENG, H. *et al.* Clonal and non-clonal chromosome aberrations and genome variation and aberration. **Genome**, v. 49, n. 3, p. 195–204, 2006.

HENG, H. H. *et al.* Chromosomal instability (CIN): what it is and why it is crucial to câncer evolution. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 3, p. 325-340, 2013.

HENG, H.H.Q. *et al.* Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 139, n. 3, 2013.

HIROHASHI, S.; KANAI, Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. **Cancer Science**, v. 94, p. 575-581, 2003.

HONG, W. S. *et al.* Establishment and characterization of cisplatin-resistant sublines of human lung cancer cell lines. **International journal of cancer**, v. 41, n. 3, p. 462-467, 1988.

HUGHES, D. e ANDERSSON, D. I. Evolutionary consequences of drug resistance: shared principles across diverse targets and organisms. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 8, p. 459-471, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Tipos de Câncer: Câncer de Pulmão**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>. Acesso em 11 Jan 2020.

KARACHALIOU, N. *et al.* KRAS mutations in lung cancer. **Clinical Lung Cancer**, v. 14, n. 3, p. 205–214, 2013.

- KARIMIAN, A. *et al.* Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair**, v. 42, p. 63–71, 2016.
- KIM, D. K. Statistical methods for estimating doubling time in in vitro cell growth. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 33, n. 4, p. 289-293, 1997.
- KOHNO, T. *et al.* Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. **Translational lung cancer research**, v. 4, n. 2, p. 156, 2015.
- KOKENEK-UNAL, T.D.; COBAN, I. Micronuclei and nuclear buds: Highlighting overlooked indicators of chromosomal damage in thyroid aspiration smears. **Diagnostic Cytopathology**, v. 45, n. 8, p. 673-680, 2017.
- KUMARI, A. *et al.* The Dual Roles of MYC in Genomic Instability and Cancer Chemoresistance. **Genes**, v. 8, 2017.
- KURAMOCHI, M. *et al.* TSLC1 is a tumor suppressor gene in human non-small cell lung cancer. **Nature Genetics**, v. 27, p.427-430, 2001.
- LEPPÄVIRTA, J. *et al.* Congenital anomalies in neurofibromatosis 1: a retrospective register-based total population study. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 13, n. 5, 2018.
- LIANG, H. *et al.* The effects of combined treatment with sevoflurane and cisplatin on growth and invasion of human adenocarcinoma cell line A549. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 6, p. 503–509. 2013.
- LINDBERG, H. K. *et al.* Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 617, n. 1-2, p. 33–45. 2007.
- LIZUKA, M. Allelic losses in human chromosome II in lung cancers. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 13, n. 1, p. 40–46. 1995.
- LODISH, H. *et al.* **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- LUK C. *et al.* Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 125, n. 2, p. 87-99, 2001.
- LUKYANOVA, N. Y. *et al.* Molecular Profile and Cell Cycle In Mcf-7 Cells Resistant to Cisplatin and Doxorubicin. **Experimental Oncology**, v. 31, n. 2, p. 87-91, 2009.
- McCLELLAND, S. E. Role of chromosomal instability in cancer progression. **Endocrine-Related Cancer**, v. 24, 2017.

McDERMOTT, M.; *et al.* In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: a practical guide with case studies. **Frontiers in Oncology**, v. 4, Mar. 2014.

McGRANAHAN, N. *et al.* Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. **European Molecular Biology Organization**, v. 13, n. 6. 2012.

MIRZAYANS, R. *et al.* Significance of wild-type p53 signaling in suppressing apoptosis in response to chemical genotoxic agents: impact on chemotherapy outcome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 928. 2017.

MIRZAYANS, R. *et al.* Roles of Polyploid/Multinucleated Giant Cancer Cells in Metastasis and Disease Relapse Following Anticancer Treatment. **Cancers**, v. 10, n. 4, p. 118, 2018.

MOLINA, J. R. *et al.* Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 5, p. 584-594, May 2008.

MOSCOW, J. A. *et al.* (2017). Drug resistance and its clinical circumvention. **Holland-Frei Cancer Medicine**, p. 1–7. 2017.

MOURA, J. V. B. *et al.* β -Ag₂MoO₄ microcrystals: Characterization, antibacterial properties and modulation analysis of antibiotic activity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 242-247, 2017.

MURAKAMI, Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. **Cancer Science**, v. 96, n. 9, p. 543-552, Sept. 2005.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

NIKOUNEZHAD, N. *et al.* Generation of cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 11-20, 2016.

OHASHI, K. *et al.* Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant disease. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n.8, p. 1070-80, 2013.

ORAIPOULOU, M. E. *et al.* In vitro/in silico study on the role of doubling time heterogeneity among primary glioblastoma cell lines. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

PENNER-GOEKE, S. *et al.* The temporal dynamics of chromosome instability in ovarian cancer cell lines and primary patient samples. **PLoS Genetics**, v. 13, n.4, 2017.

PLUMMER, M. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **Lancet Glob Health**, v. 4, n. 9, p. 609-616, Sept, 2016.

POTAPOVA, T.; GORBSKY, G. J. The consequences of chromosome segregation errors in mitosis and meiosis. **Biology**, v. 6, n. 12, 2017.

PUBMED. US National Library of Medicine National Institutes of Health. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em 13 de janeiro de 2020.

PUIG, P.E.; *et al.* Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. **Cell Biology International**, v. 32, p. 1031-1043, 2008.

RANGEL, N.; *et al.* New insights in the cytogenetic practice: karyotypic chaos, non-clonal chromosomal alterations and chromosomal instability in human cancer and therapy response. **Genes**, v. 8, n. 6, p. 155, 2017.

RELLI, V. *et al.* Abandoning the notion of non-small cell lung cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n.7, 2019.

RJIBA-TOUATI, K. *et al.* Induction of DNA fragmentation, chromosome aberrations and micronuclei by cisplatin in rat bone-marrow cells: Protective effect of recombinant human erythropoietin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 747, n. 2, p. 202–206, 2012.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Á; *et al.* Residential radon and small cell lung cancer. A systematic review. **Cancer Letters**, v. 426, p. 57–62, 2018.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda**. 2012. 100 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012

SAITOH, M. Involvement of partial EMT in cancer progression. **The Journal of Biochemistry**, v. 164, n. 4, p. 257-264, Oct. 2018.

SALMINA, K. *et al.* The cancer aneuploidy paradox: in the light of evolution. **Genes**, v. 10, n. 83, 2019.

SATOH, H., Suppression of tumorigenicity of A549 lung adenocarcinoma cells by human chromosomes 3 and 11 introduced via microcell-mediated chromosome transfer. **Molecular Carcinogenesis**, v. 7, n. 3, p. 157–164, 1993.

SEMENOVA, E.A. *et al.* Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. **Genes & Development**, v. 29, p. 1447–1462, 2015.

SENTEBANE, D. A. *et al.* The role of tumor microenvironment in chemoresistance: to survive, keep your enemies closer. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, July. 2017.

SHEN, M. *et al.* Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 149, Apr, 2019.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, Oct. 2003.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin resistance: molecular basis of multifaceted impediment. in: teicher, b.a. cancer drug resistance. **Cancer Drug Discovery and Development**, p. 283-308, 2006.

SIEGEL, R. L.; *et al.* Cancer statistics, 2017 **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 7-30, Jan./Feb. 2017.

SILVA, M.R. **Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito.** 2009. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SOBHANIFAR, M. *et al.* Induction of cytotoxicity and apoptosis in FLT3 mutant expressing cells using novel pyrimido cyanoacrylates and quinoline derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 893-905, 2018.

SOMMER, S. *et al.* Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1534, 2020.

SPEICHER, M. R. *et al.* Analysis of chromosomal alterations in non-small cell lung cancer by multiplex-FISH, comparative genomic hybridization, and multicolor bar coding. **Laboratory investigation**, v. 80, n. 7, p. 1031-1041, 2000.

SPENCER, S. L. *et al.* Modeling Somatic Evolution in Tumorigenesis. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 8, e108, 2006.

SRIVASTAVA, R. K. *et al.* Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. **Human and Experimental Toxicology**, v. 32, n. 2, 2013.

SUNG H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 0, n. 0, 2021.

SZAKÁCS, G. *et al.* Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 219-234, 2006.

TORRE, L. A.; *et al.* Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 65, ed. 2, p. 87-108, Mar. 2015.

TOULANY, M. *et al.* Cisplatin-mediated radiosensitization of non-small cell lung cancer cells is stimulated by ATM inhibition. **Radiotherapy and Oncology**, v. 111, n. 2, p. 228–236, 2014.

TRIGOS, A.S. *et al.* How the evolution of multicellularity set the stage for cancer. **British Journal of Cancer**, v. 118, p. 145-152, 2018.

VAN JAARSVELD, R. H.; KOPS, G. J. P. L. Difference Makers: Chromosomal Instability versus Aneuploidy in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 10, p. 561–571, 2016.

VARELLA-GARCIA, M. Chromosomal and genomic changes in lung cancer. **Cell Adhesion & Migration**, v. 4, n. 1, p. 100-106. 2009.

VASCONCELOS, D. S. *et al.* Numerical aberrations of chromosome 17 and TP53 in brain metastases derived from breast cancer. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2594-2600, 2013.

VON LOGA, K.; GERLINGER, M. Cancer (r)evolution. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 8, p. 1051–1052, 2017.

Wosikowski, K. *et al.* Reduced growth rate accompanied by aberrant epidermal growth factor signaling in drug resistant human breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1497, n. 2, p. 215–226, 2000.

WU, C.-I. *et al.* The Ecology and Evolution of Cancer: The Ultra-Microevolutionary Process. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p. 347–369, 2016.

WU, G. X.; RAZ, D. J. Lung Cancer Screening. Lung Cancer, In: **Cancer Treatment and Research**, v. 170, p. 1–23, 2016.

XU, M. *et al.* Leptin induces epithelial-to-mesenchymal transition via activation of the ERK signaling pathway in lung cancer cells. **Oncology Letters**, v. 16, n. 4, p. 4782-4788, July. 2018.

YAKISICH, J. S. Chemoresistance of lung and breast cancer cells growing under prolonged periods of serum starvation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 8, p. 2033-2043, 2017.

YAN, C. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor- α through bone morphogenic protein-2. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 5. p. 2247–2258, May 2010.

YANG, X. *et al.* Intensified beclin-1 mediated by low expression of mir-30a-5p promotes chemoresistance in human small cell lung cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43. P. 1126-1139, 2017.

YATES, L. R.; CAMPBELL, P. J. Evolution of the cancer genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 11, p. 795–806, 2012.

YE, C. J. *et al.* Micronuclei and genome chaos: changing the system inheritance. **Genes**, v. 10, n. 5, p. 366, 2019.

YUAN, M. *et al.* The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 4, n. 61, 2019.

ZARGAR, A. *et al.* Overcoming the challenges of cancer drug resistance through bacterial-mediated therapy. **Chronic Diseases and Translational Medicine. online**. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095882X19300866>. Acesso em 25 Jan 2020.

ZHANG, R. *et al.* CNTN-1 Enhances chemoresistance through inducing emt in human lung adenocarcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition by targeting the PI3K/Akt pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 465-480, 2017.

ZHANG, W.; YU, Y. The important molecular markers on chromosome 17 and their clinical impact in breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5672-5683, Dec. 2011.

ZHOU, Y. *et al.* Establishment of a human hepatoma multidrug resistant cell line in vitro. **World Journal Gastroenterology**, v. 16, n. 18, p. 2291-2297, May. 2010.

ZHOW, G. *et al.* miR-200c enhances sensitivity of drug-resistant non-small cell lung cancer to gefitinib by suppression of PI3K/Akt signaling pathway and inhibites cell migration via targeting ZEB1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 113-119, Jan. 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Lista de cariótipos encontrados na linhagem A549-P.

53~66, XXY, -X [3], -Y[4], t(1;6)(p21;q22)[20], -1[3], -2[19], -3[20], -4[20], -5 [3], -6[12], -6[6], del(6)(p23-pter)[3], -8[4], -9[7], -9[5], -10[4], -11[10], del(11)(q23-qter)[10], -12[5], -13[16], -14[8], -15[9], +15[2], -16[7], +17[10], -18[15], -19[12], -20[13], -21[14], -22[16], + mar1[21], +mar2[21], +mar3[15], +mar4[11], +mar5[4], +mar6[2][cp21]

Metáfases	Perfil cariotípico
1	53, XX, -Y, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -6, -10, -11, del(11)(q23-qter), -13, -15, +17, -18, -19, -19, -20, -21, -21, -22, -22, + mar1, +mar2
2	60, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, del(6qter), -8, -9, -9, del(14qter), -15, 15?, +17, -18, -19, -20, -21, -22, +mar1, +mar2
3	66, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, +5, -6, -8, del(11)(q23-qter), +12, -13, -14, -16, +17, -18, +20, -21, -22, -22, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4, +mar5
4	60, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -8, -8, -9, del(11)(q23-qter), -13, -15, -16, +17, -18, -19, -20, -21, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4, +mar5, +mar6
5	58, XX, -Y, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -6, -9, -11, -13, -15, -18, -18, -19, +20, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3
6	61, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -9, -9, -11, -13, +17, -19, -20, -21, +mar1, +mar2
7	61, XX, -Y, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -6, del(11)(q23-qter), -13, +17, -18, -20, -21, -22, +mar1, +mar2
8	62, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6 del(6pter), -9, -11, -13, -18, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3
9	59, XX, -Y, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -9, -11, -14, -15, -16, -18, -19, -20, -21, -22, -22, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4, +mar4, +mar5
10	60, XXY, -2, -3, -4, -6, -6, -11, del(11)(q23-qter), -13, -15, -16, +17, -19, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4

11	60, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -6, -9, -9, -12, -13, +17, -18, -18, -19, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4, +mar5, +mar6
12	61, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -5, -6, -9, -11, -13, -14, -15, -15, +16, -18, -20, +21, -22, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4
13	58, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -6, -9, -10, del(11)(q23-qter), -13, -14, -14, -15, +17, -18, -22, +mar1, +mar2,
14	59, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -9, -11, -12, -13, -14, -15, -15, -20, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4
15	64, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -7, -12, +17, +17, -18, -19, -21, -22, +mar1, +mar2
16	60, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -9, -9, del(11)(q23-qter), -13, -14, +15, -16, -18, -19, -20, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4
17	60, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -9, -9, del(11)(q23-qter), -13, -14, +15, -16, -18, -19, -20, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar2, +mar4
18	58, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -5, -6, -6, -7, del(11)(q23-qter), -13, -14, -15, +17, -18, -19, -20, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3
19	60, XY, -X, -1, t(1;6)(p21;q22), -2, -2, -3, -4, -5, -6, -8, -10, -10, -11, del(11)(q23-qter), -15, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4
20	61, XY, -X, -1, t(1;6)(p21;q22); -2, -4, -6, -8, -10, -12, -14, -18, -20, +mar1, +mar2, +mar3
21	59, XY, -X, t(1;6)(p21;q22), -3, -4, -6, -10, -11, -13, -15, -16, -18, -19, -20, -22, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4

APÊNDICE B – Lista de cariótipos encontrados na linhagem A549-R30.

58~64, XXY, t(1;6)(p21;q22)[25], -2[23], -3[22], -4[21], -5[9], -6[23], del(6)(pter)[14], -7[4], -8[10], -9[7], -11[11], del(11)(q23-qter)[4], +11[3], -12[11], -13[19], -14[5], -15[10], +16[6], +17[12], +17[12], -18[19], -18[3], -19[13], -20[13], -21[23], -22[20], +mar1[25], +mar2[20], +mar3[4][cp25]

Metáfases	Perfil cariotípico
1	61, XXY, t(1;6)(p21;q22), -3, -4, -5, -6, del(6pter), -12,-13, -15, +17, +17, -18, -18, -19, -21, -22, +mar1, +mar2
2	62, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -8, -11, -13, -18, -19, -21, +mar1, +mar2, +mar3
3	63, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -6, del(6pter), -8, -13, -15, +17, +17, -18, -19, -21, -22, +mar1, +mar2
4	64, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -5, -6, del(6pter), -9, -14, +17, +17, -18, -20, -22, +mar1, +mar2
5	63, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -12, -13, +17, +17, -18, -21, -22, +mar1, +mar2
6	60, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -12, -13, -15, +17, -18, -20, -21, -22, +mar1, +mar2
7	63, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -11, -13, +17, -18, -21, -22, +mar1, +mar2
8	63, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -11, -13, -15, +17, +17, -18, -21, -22, +mar1, +mar2
9	60, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -5, -6, del(6pter), -12, -13, +16, +17, -18, -19, -20, -21, -22, -22, +mar1, +mar2
10	62, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -9, -15, +16, +17, +17, -18, -19, -21, -22
11	62, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -11, -12, -15, +17, -18, -21, -22, +mar1, +mar2
12	60, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -8, -12, -13, -16, +17, -18, -19, -20, -21, +mar1, +mar2
13	58, XXY, -1, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -6, -8, -10, -11, -13, +17, +17, -18, -19, -21, -22, +mar1
14	62, XXY, t(1;6)(p21;q22), -3, -4, -6, -7, -8, -8, +11, -15, +17, +17, -19, -20, -21, -22, +mar1

15	62, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, del(6pter), -8, -11, -14, -15, +17, +17, -18, -19, -21, +mar1, +mar2
16	64, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -5, -6, del(6pter), -11, +12, -13, +17, -20, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3
17	63, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -6, -11, -13, +17, +17, -18, -20, -21, -22, +mar1, +mar2
18	XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -4, -5, -6, del(11)(q23-qter), -12, -13, -15, +17, +17, -28, -21, -22, +mar1, +mar2, +mar3
19	60, XXY, t(1;6)(p21;q22); -2, -3, -4, -6, -8, -11, del(11)(q23-qter), -14, +16, +17, -18, -20, -21, -22, -22, +mar1
20	61, XX, -Y, t(1;6)(p21;q22); -2, -4, -5, -6, del(6)(pter), t(8;15)(q24;q11); -9, -13, +17, -18, -19, -21, -22, +mar1, +mar2
21	58, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -4, -6, -7, -8, -9, -11, -12, -13, -14, -15, +16, +17, -19, -20, -22, +mar1
22	58, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -10, +11, del(11)(q23-qter), -12, -13, +16, +17, -18, -18 -19, -20, -21, -22, +mar1, +mar2
23	62, XXY, t(1;6)(p21;p22), -2, -3, -5, -6, -8, +11, del(11)(q23-qter), -12, -13, -14, -16, +17, +17, -18, -21, -22, +mar1, +mar2
24	58, XX, -Y, t(1;6)(p21;q22); -2, -3, -4, -4, -6, -6, -9, -11, -12, -13, +17, -18, -19, -20, -21, -22, +mar1, mar2, +mar3, +mar4
25	57, XXY, t(1;6)(p21;q22), -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -11, -12, -13, -14, +16, +17, -18, -18, -21, -22, +mar1, +mar2