



CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR PRIMÁRIA DE CÂNCER DE BOCA HUMANO

Gabriela Jouglard Vasques Amado¹
Ivana Grivicich²

Resumo

Câncer de boca é um dos tumores mais comuns no mundo, ocupando no Brasil o sexto lugar entre todos os tipos de câncer. Mais de 90% das lesões de boca é representada pelo carcinoma epidermoide, que exhibe elevadas taxas de mortalidade. Os objetivos desse estudo foram cultivar e caracterizar células derivadas de tumores de boca para elucidar mecanismos moleculares associados com as particularidades desses tumores. Para isto, foi colhida amostra de lesão em glândula salivar menor, de região jugal à esquerda ressecada do paciente FRS, masculino, 80 anos, fumante, alcoolista. Parte da peça cirúrgica foi encaminhada para realização do cultivo celular. Inicialmente a peça foi mantida em meio de cultura F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Entre as passagens 10 – 20 foram realizados testes de proliferação, cariotipagem, curva de dose-resposta com o antineoplásico cisplatina. Nossos resultados até o momento são: 1) o anatomopatológico demonstrou ser um Cistoadenocarcinoma Papilífero; 2) a proliferação, verificada com base no tempo de duplicação celular, mostrou duplicação celular em 40 horas; 3) a avaliação citogenética, realizada por cariótipo convencional (banda GTG), mostrou como principais alterações numéricas: -Y, -5,-9,-16,-17,-19,-22; poliploidia (3n, 4n); e como principais alterações estruturais: cromossômo dicêntrico, quebra cromatídica, quebra centromérica, e translocação balanceada e não balanceada. 4) a curva de dose-resposta com a cisplatina, realizada com ensaio colorimétrico de MTT, mostrou valores de IC₅₀ de 8,16 ± 1,7 µg/mL. Em síntese, demonstramos que foi possível cultivar esse tumor, que ele possui um cariótipo e comportamento compatível com células neoplásicas e relativa sensibilidade ao antineoplásico cisplatina.

Palavras-chave: cariótipo, tempo de duplicação, cisplatina

INTRODUÇÃO

O câncer de boca é uma denominação que inclui várias localizações primárias de tumor, incluídas nos códigos C00 a C06 da Classificação Internacional das Doenças (CID 10). A cavidade oral é o espaço delimitado pelos lábios anteriormente, e mucosa jugal lateralmente; palato duro e mole superiormente, língua e arcada dentária inferiormente e posteriormente pelo istmo da garganta. No Brasil, dados dos Registros de Câncer de Base Populacional mostram que o câncer da boca ocupa o 4º lugar entre os tipos de câncer mais incidentes no sexo masculino. Além disso, os dados dos Registros Hospitalares de Câncer brasileiros também mostram que a maioria dos pacientes chega aos hospitais em fase avançada, cujo tratamento deixa de ser curativo, e na maioria dos casos é mutilante, o que influi no tempo de sobrevivência desses pacientes (INCA, 2015).

1 Acadêmica de Medicina (ULBRA) – Bolsista PIBIC/CNPq – gabivasaques@gmail.com

2 Professora do curso de Medicina e do PPGBioSaúde (ULBRA) – grivicich@terra.com.br

Os principais fatores de risco para o câncer da cavidade oral são o tabagismo, o etilismo, dieta e as infecções pelo Papiloma Vírus Humano (HPV). Estudos apontam que o hábito de fumar e beber estabelece um sinergismo entre esses dois fatores de risco, aumentando 30 vezes o risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer. O fumo é responsável por cerca de 42% dos óbitos por essa neoplasia. Já o etilismo corresponde a, aproximadamente, 16% dos óbitos. As taxas de mortalidade por câncer da cavidade oral apresentam um declínio na população masculina na maioria dos países. Em mulheres, esse comportamento ainda não pode ser observado, uma vez que o início do uso do tabaco pelas mulheres foi posterior ao dos homens (INCA, 2015).

Os tipos de câncer que são comuns em uma população, por exemplo, variam de país para país, e estudos de indivíduos migrantes mostraram que são fatores do local onde vivem e não de onde vieram que governam o risco de desenvolverem câncer. Embora seja difícil determinar quais os fatores específicos do ambiente ou estilo de vida que são críticos, e muitos ainda não conhecidos, alguns deles já foram identificados com precisão. A obesidade, por exemplo, está correlacionada com o aumento do risco de câncer, e esse relacionamento parece ser causal. De longe, a causa ambiental mais importante do câncer de boca é o fumo, o qual não é somente responsável por quase todos os tipos de câncer de pulmão, mas também aumenta a incidência de vários outros tipos de câncer, como o câncer de bexiga. Se pudéssemos impedir o uso do tabaco, estima-se que seria possível prevenir 30% de todas as mortes por câncer. Não se conhece nenhuma outra política de prevenção ou tratamento que teria tal impacto nas taxas de morte por câncer (ALBERTS et al., 2011).

Os autores relatam que esses doentes apresentam lesões predominantemente infiltrativas em relação às apresentações mais exófitas das lesões em pacientes com mais de 60 anos. Ainda estes pacientes parecem desenvolver tumores mais indiferenciados do ponto de vista histológico sendo esse fato, por si só, fator de impacto negativo no prognóstico. Tendo em vista o surgimento precoce do câncer de boca sem associação aos fatores de risco, é provável que este grupo deva apresentar uma predisposição genética importante, com falhas em mecanismos de reparo de DNA, mutações em genes supressores de tumor e oncogenes que conferem um decréscimo na sobrevida (ALMEIDA, et al., 2011).

Diversas razões sustentam o uso de linhagens celulares derivadas de tumor como modelo experimental para estudo do câncer. Dentre as quais podemos listar: 1) facilidade de manuseio e manipulação; 2) alta homogeneidade do cultivo; 3) elevado grau de similaridade com o tumor original; 4) disponibilidade em número e variedade de linhagens celulares; 5) acessibilidade imediata para a comunidade científica; 6) fonte auto-replicativa ilimitada de linhagens celulares contínuas; 7) facilidade de substituição de culturas contaminadas pelas respectivas linhagens celulares congeladas; 8) reprodutibilidade dos resultados em condições padrão pré-estabelecidas (GAZDAR, et al. 2010).

Assim, o objetivo desse estudo foi cultivar e caracterizar células derivadas de tumores de boca para elucidar mecanismos moleculares associados com as particularidades desses tumores.

METODOLOGIA

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Ulbra, sob protocolo número: 668.455.

Essa amostra foi removida da lesão do paciente FRS, masculino, 80 anos, semi-alfabetizado, viúvo, vigia aposentado, natural do Ceará procedente de Teresina, fumante 70 anos/maço, alcoolista, com lesão em glândula salivar menor de região jugal à esquerda ressecada. Após ressecção cirúrgica, parte da peça retirada foi para análise de Anatomopatológico que determinou o tipo histológico do tumor como Cistoadenocarcinoma Papilífero (M84403 – grau de diferenciação G1 – bem diferenciado).

Outra parte da peça foi conservada e levada para laboratório para realização do cultivo primário. Inicialmente a peça foi colocada em meio de cultura F12 para ocorrer o crescimento. Entre as passagens 10 – 20 foram feitos testes de duplicação, cariotipagem, imunohistoquímica, curva de dose de tratamento com cisplatina e ensaio clonogênico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de proliferação foi verificada com base no tempo de duplicação celular (*population doubling time*), utilizando o *Doubling-Time Calculator*. As células cultivadas a partir da amostra tumoral apresentaram taxa duplicação da sua população de 40 horas. A avaliação citogenética (SEABRIGHT, 1971), realizada por cariótipo convencional (banda GTG) demonstrou que em média existem 48 cromossomos por metáfases, onde o número de cromossomos por células varia de 35 a 91. Além disso, 66% das células analisadas apresentaram alterações cromossômicas e 38% cariótipo 46,XY, entretanto, destes 4% apresentaram alterações estruturais. Em virtude das alterações numéricas e estruturais observou-se 32 cariótipos diferentes.

Em relação as alterações numéricas do total de metáfases, 52% apresentaram hipodiploidia, 10% hipotetraploidia e 4% endoreduplicação (considerada também como hipotetraplóide). Os cromossomos que mais sofreram este tipo de alteração foram o Y e 9 (34% e 32%, respectivamente), seguido por 6,12 e 16 (12%); 20 e 22 (10%); 5 e 13 (8%); 2,3,11,17,19,21 (6%); 7,8,14,15,18 (4%); 1 e 10 (2%). Os cromossomos Y,2,3,5,6,9,11,12,17,18,19,20,21 estiveram duplamente ausentes em uma célula hipotetraplóide e o cromossomo 22 não esteve presente nesta mesma metáfase. Os cromossomos X e 4 estiveram presentes em todas as metáfases analisadas. Além disso, os cromossomos Y, 1, 2 e 4 foram os cromossomos que mais apresentaram alterações estruturais. Foram identificadas inversões (cromossomos 2 e 3), deleção (8), cromossomo dicêntrico [(17;Y), (4;Y), (4;21) e (2;Y)], quebra centromérica (1 e 4), quebra cromatídica (1 e 6) e translocação [(2;5) e (3;11)]. Não encontramos nenhum relato de cariótipo de cistoadenocarcinoma papilífero na literatura. Entretanto, em outros tumores de glândulas salivares menores as alterações cromossômicas são bastante heterogêneas, incluindo translocações envolvendo os cromossomos 1, 5, 7, 19, 21 (TONON, et al., 2004) e translocações entre os cromossomos 3, 4, 8, 12, 22 (MANOR, et al, 2012).

A curva de dose-resposta com a cisplatina, realizada com ensaio colorimétrico de MTT, mostrou valor de IC50 de $8,16 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$, mostrando sensibilidade à cisplatina. Foi utilizada a linhagem celular de carcinoma de boca KB para fins de comparação, que apresentou valor de IC50 ($6,47 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$) equivalente ao verificado com o cultivo primário. Esses valores estão de acordo com o encontrado na literatura para a cisplatina (ULUKAYA et al, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, desenvolvemos e caracterizamos uma linhagem de cistoadenocarcinoma papilífero, tumor de boca raro que tem poucos estudos mostrando suas peculiaridades moleculares. Foi possível cultivar esse tumor e revelar que ele possui um cariótipo e comportamento compatível com células neoplásicas e relativa sensibilidade ao antineoplásico cisplatina.

REFERÊNCIAS

- Alberts, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed. p. 1205-1267, 2010.
- Almeida, F.C.S. et al. Fatores prognósticos no câncer de boca. **Rev Bras Ciên Saúde**, v. 15, p. 471-478, 2011.
- Gazdar, A.F. et al. Lung Cancer Cell Lines as Tools for Biomedical Discovery and Research. **J Natl Cancer Inst.**, v. 102, p. 1310–1321, 2010.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. Acesso em 02 ago, 2015.
- Manor, E. et al. Chromosomal aberrations in minor salivary gland pleomorphic adenoma. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 70, p. 2798-2801, 2012.
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v. 2, p.971-972, 1971.
- Tonon, G. et al. Multiple reciprocal translocations in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 152, p. 15-22, 2004.
- Ulukaya, E. et al. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. **Toxicol in Vitro**, v. 22, p. 232-239, 2008.