

Análise da dinâmica da variância clonogênica em colônias de células não-tumorais

Autora: Daphne Tórgo de Lemos

Orientador: Guido Lenz

Introdução

Tolerância é um mecanismo que envolve diversos fatores moleculares alternativos que conferem às células a capacidade de sobreviver à determinadas pressões e condições específicas impostas pelo seu meio. Exemplo de mecanismos moleculares que podem levar à tolerância são **alterações epigenéticas**, as quais, diferente de mutações herdáveis, podem variar ao longo do tempo e, portanto, serem refletidas em **diferentes níveis de tolerância e crescimento** de células tumorais. Seguindo esse racional, nosso grupo desenvolveu o **ensaio de variância clonogênica**, através do qual demonstramos que o fenótipo de crescimento celular e tolerância / sensibilidade é **instável**: quando células únicas são postas para crescer e formar colônias, observamos que a variância da taxa de crescimento entre **colônias pequenas** é maior do que a variância entre as colônias maiores. Isso porque em uma colônia menor, suas células crescem de maneira similar, pois existe um parentesco maior entre elas e, assim, cada colônia possui uma resposta particular. Por outro lado, conforme as **colônias aumentam de tamanho**, as células dentro dela terão se dividido mais (e, portanto, terão um parentesco mais

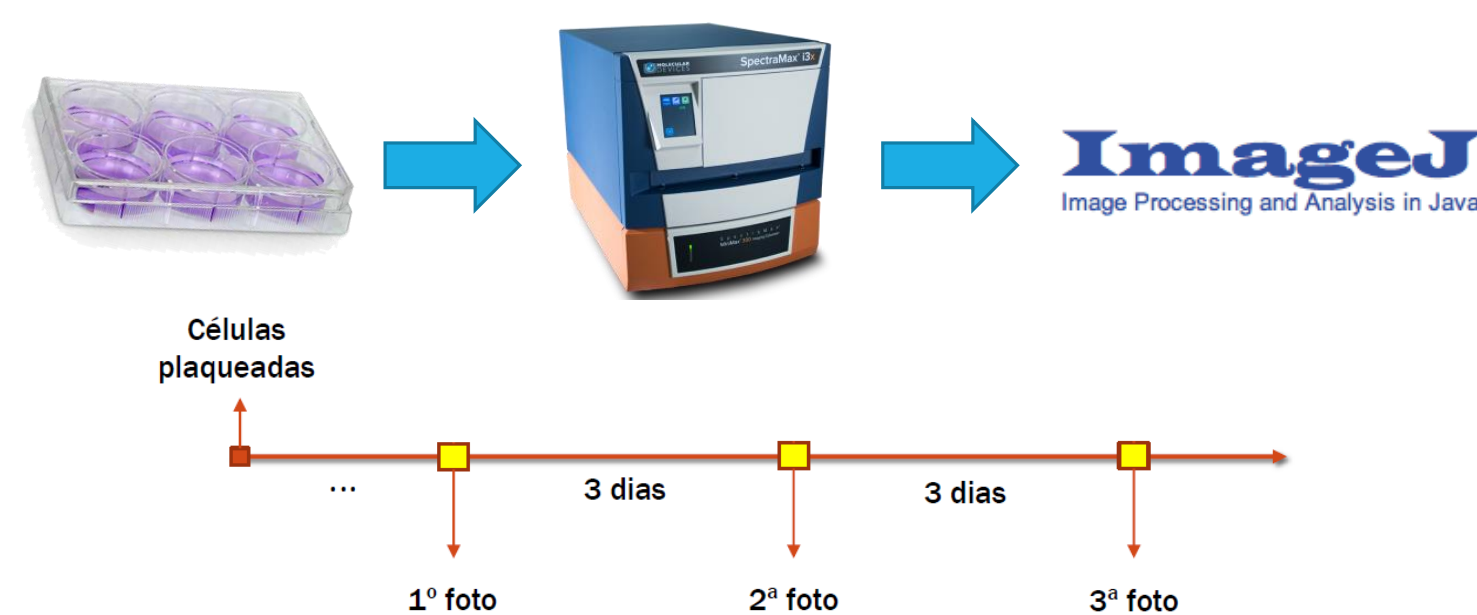
distante) e isso faz com que as células dentro da colônia cresçam de forma diferente. Assim, **a variância entre as colônias diminui conforme elas crescem** porque as colônias, como um todo, terão médias de crescimento parecidas, já que dentro de cada colônia existirão mais taxas de crescimento diferentes de células individuais. A partir desse teste, nosso grupo coletou **dados sobre a variância do fenótipo de crescimento em diversas linhagens** tumorais sob condições de controle e tratamento com quimioterápicos, e fomos capazes de compará-las entre si, sendo observado que não existe uma diferença significativa de instabilidade no crescimento entre as linhagens não tratada com quimioterápicos, fato que ocorreu apenas em linhagens tratadas. Apesar disso, ainda não existem análises que testam se esse comportamento é exclusivo de células tumorais, uma vez que estas tem como característica uma instabilidade a nível genômico e uma grande plasticidade devido a alterações de diversas vias de sinalização, **ou se ele também se faz presente em células não-tumorais**.

Objetivo

Avaliar a dinâmica da variância clonogênica em células não-tumorais humanas e se essa característica é ou não exclusiva de células tumorais.

Materiais e Métodos

Células de fibroblastos humanos da linhagem MRC-5 foram cultivadas em DMEM LOW suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufas a 37°C e 5% de CO₂. Duzentas células foram plaqueadas por poço, em uma placa de 6 poços, e mantidas em cultura até formarem colônias. As colônias foram fotografadas com o aparelho SpectraMax® i3/i3x MiniMax 300 Imaging Cytometer, seguidas de mais duas fotos separadas por intervalos de 3 dias. A contagem de células por colônia foi feita através do software ImageJ e a taxa de crescimento de cada colônia foi calculada. A fim de medir se as células estão crescendo de maneira similar, foi calculado a **variância de taxa de crescimento entre colônias de diferentes tamanhos iniciais** e esses dados foram plotados em um gráfico onde o eixo x é o tamanho inicial da colônia e o eixo y é a variância da colônia. A ocorrência ou não de instabilidade fenotípica foi determinada através de regressão linear.



Resultados e Conclusão

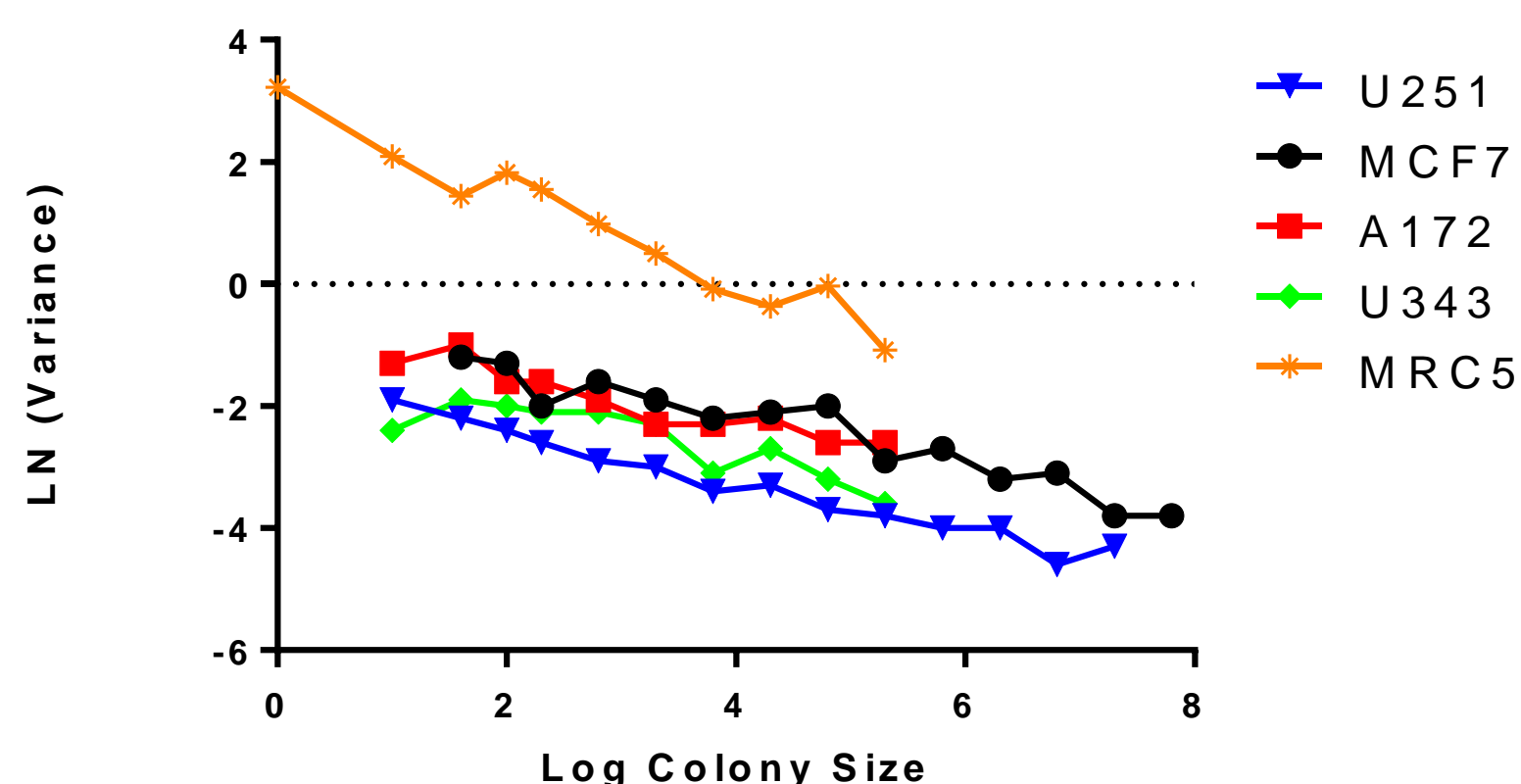


Figura 1. Gráfico das regressões lineares das amostras de linhagens tumorais controles (U251, MCF7, A172, U343) e da amostra de linhagem saudável (MRC-5), relacionando variância, no eixo y, por tamanho da colônia, no eixo x.

Foi observado com os resultados obtidos até o momento que existe uma similaridade na instabilidade do fenótipo de crescimento das colônias de células saudáveis quando comparadas aos dados obtidos anteriormente de colônias de células tumorais. Os dados da linhagem não tumoral MRC-5 demonstram um fenótipo de crescimento com maior variância e que decresce mais rápido que os fenótipos tumorais, conforme as colônias aumentam de tamanho.

Podemos concluir que os dados indicam que essa característica não é exclusiva de células tumorais e que a linhagem em questão tem um fenótipo de crescimento mais instável.