Efeitos da inibição da via de sinalização RAS/RAF em células de tumores sólidos pediátricos

Palavras-Chave: via sinalização RAS/RAF, terapia alvo-dirigida, tumores sólidos pediátricos

Bruna Vasconcelos Martins, IB - UNICAMP
Phd. Larissa Akemi Kido de Barros, Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A Boldrini
Drª. Mariana Camargo Maschietto (orientadora), Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A Boldrini, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UNICAMP
Mª. Mayara Ferreira Euzébio (co-orientadora), Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A Boldrini, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UNICAMP
Milena Rodrigues Marusco, Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A Boldrini
M. Renato David Puga, Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A Boldrini

INTRODUÇÃO

O câncer infanto-juvenil corresponde a cerca de 3% de todos os tumores malignos observados nos Registros de Câncer de Base Populacional Brasileiros. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para o triênio 2023-2025 é de 7900 casos novos de câncer por ano em crianças e adolescentes (SANTOS et al., 2023).

Um dos grandes desafios para o desenvolvimento de melhores tratamentos para cânceres em crianças e adolescentes é a escassez de modelos pediátricos; consequentemente, a grande maioria dos novos medicamentos aprovados para terapia alvo são para uso adulto. Entre 2007 e 2022, dos medicamentos testados em ensaios clínicos para câncer de adulto, 27% foram avaliados e aprovados pela EMA e 40% pelo FDA, e apenas 7 medicamentos foram aprovados exclusivamente para crianças (2 pelo EMA e 5 pela FDA) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Dessa forma, torna-se necessária contínua a pesquisa dos mecanismos envolvidos nos tumores pediátricos, tanto para o melhor entendimento de sua biologia como também para permitir um tratamento mais preciso dos pacientes.

De forma geral, 6,1% dos tumores sólidos pediátricos apresentam alterações em genes da via *RAS/RAF*. A via se inicia com a ativação de RAS que, por sua vez, ativa a RAF, desencadeando uma sequência de fosforilações que envolve as quinases MEK e ERK. Esta, quando fosforilada, atua em moléculas responsáveis pela regulação de diversos processos relacionados à sobrevivência celular (BAHAR; KIM; KIM, 2023). A desregulação desta via é uma das alterações mais recorrentes em câncer (YAEGER; CORCORAN, 2019), geralmente associada a mutações que resultam na superexpressão de genes da via, resultando em uma sinalização intensificada, que podem culminar na formação de tumores. Nesse contexto, terapias alvo-dirigidas vêm sendo desenvolvidas para atuar sobre moléculas específicas associadas a essas mutações. Essa estratégia terapêutica confere maior especificidade ao tratamento, potencializando a eficácia e reduzindo efeitos colaterais.

Neste trabalho, foram utilizados dois fármacos que atuam sobre genes da via *RAS/RAF*, sendo, portanto, potenciais agentes terapêuticos em estratégias alvo-dirigidas. Os medicamentos Selumetinib e Trametinib são ambos inibidores alostéricos de MEK, uma quinase que atua *downstream* a RAS na cascata de sinalização. A inibição de MEK pode contribuir para o controle da ativação exacerbada da via causada por mutações, ajudando assim a conter o crescimento tumoral.

Por fim, a validação de modelos PDX e de tumores derivados desses modelos é de grande importância para os estudos pré-clínicos, uma vez que eles têm a capacidade de recapitular a heterogeneidade histológica e

genética dos tumores no momento da avaliação terapêutica. Nosso grupo de pesquisa já padronizou previamente o protocolo para a formação de esferoides a partir de tumores primários implantados em modelos PDX.

OBJETIVOS

Selecionar tumores sólidos pediátricos com mutações em genes da via de sinalização celular *RAS/RAF* e testar drogas alvo-dirigidas em modelos *in vitro*, usando tumoroides derivados destes tumores.

METODOLOGIA

Este trabalho é parte de um projeto em andamento no laboratório, que sequenciou 330 tumores sólidos, dos quais 78 foram armazenados também como células vivas após implante em modelos PDX. A análise preliminar dos dados de exomas dos pacientes mostrou que 20.1% (68/330) dos tumores possuem mutação em genes da via *RAS/RAF*, sendo 20,6% (14/68) patogênica ou patogênica-like (**Tabela 1**). Destes 14, 8 tinham células vivas armazenadas no biobanco. Como controle negativo de sensibilidade aos fármacos, foram selecionados tumores de mesmo diagnóstico histopatológico sem mutação em genes da via *RAS/RAF* e que tenham amostras armazenadas no biobanco.

Tabela 1: Tumores selecionados para o estudo, com mutações em genes da via *RAS/RAF* e com células vivas armazenadas no biobanco.

ID amostra	CHROM	POS	REF	ALT	CONSEQUENCE	GENE	HGVSc	Diagnóstico
ID_01	Chr1	114713909	G	T	missense_variant	KRAS	NM_002524.5:c.181C>A	Neuroblastoma
ID_02	Chr12	25245350	C	T	missense_variant	KRAS	NM_004985.5:c.35G>A	Tumor de Wilms
ID_03	Chr12	25245350	C	T	missense_variant	KRAS	NM_004985.5:c.35G>A	Osteossarcoma
ID_04	Chr12	25245350	C	T	missense_variant	KRAS	NM_004985.5:c.35G>A	Rabdomiossarcoma
ID_05	Chr10	87961054	C	CA	frameshift_variant	PTEN	NM_000314.8:c.968dup	Osteossarcoma
ID_06	Chr1	114713879	A	G	missense_variant	KRAS	NM_002524.5:c.211T>C	Sarcoma Sinovial
ID_07	Chr10	11237845	GGA	G	frameshift_variant	MTOR	NM_004958.4:c.2204_2205del	Rabdomiossarcoma
ID_08	Chr1	11109304	CGA	C	frameshift_variant	MTOR	NM_004958.4:c.7512_7513de	Rabdomiossarcoma

Uma vez selecionadas as amostras, os fragmentos de tumores foram dissociados mecânica e enzimaticamente para obtenção de células para plaqueamento em cultura 3D (**Figura 1**). Após a dissociação, o lisado de células e o resto dos fragmentos foi passado no *cell strainer* de 40 µm. O eluato foi lavado com meio de plaqueamento e centrifugado. O pellet de células obtido foi ressuspendido e contado com uma câmara de Neubauer. Foram plaqueadas 10.000 células por poço em placas de 96-well para formação de esferoides.

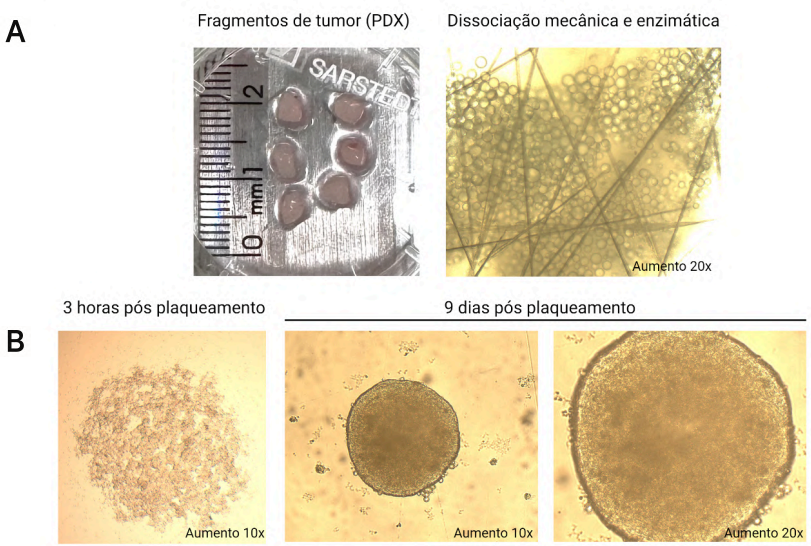

Figura 1: A. Fragmentos de tumor (PDX) antes e após dissociação mecânica e enzimática. **B.** Formação de esferoides após plaqueamento das células obtidas com a dissociação.

O teste inicial com os fármacos foi realizado com as drogas selumetinib e trametinib a 10µM, 1µM, 0.1µM e 0.01µM, que têm como alvo a quinase MEK, presente na via *downstream* a *NRAS.* Juntamente foram feitos os controles vivos (0,2% DMSO) e mortos (25% DMSO). Os resultados do primeiro teste foram utilizados para o cálculo de IC50, que representa a concentração do fármaco necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular. Com base nesses valores, foi realizado um segundo experimento empregando as concentrações IC50, IC50×3 e IC50/3, a fim de validar os dados obtidos inicialmente e avaliar de forma mais precisa os efeitos dose-dependentes dos fármacos sobre os esferoides.

A viabilidade dos esferoides após 72 horas de tratamento foi realizada utilizando o kit CellTiter-Glo® 3D Cell Viability (Promega). Para este ensaio, 50 µl de CellTiter-Glo® foi adicionado a 50 µl de meio contendo os esferoides em uma placa branca opaca. A mistura foi homogeneizada e incubada em um agitador de placa por 25 min. O resultado de luminescência é diretamente proporcional à quantidade de células vivas, e foi obtido pelo equipamento Sinergy H1 (Biotek). Os dados foram analisados pelo teste estatístico One-Way ANOVA, a fim de comparar a viabilidade celular obtida em cada dose com o controle vivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados parciais foram obtidos a partir de experimentos com amostras de sarcoma sinovial portadoras de mutação em *NRAS* (ID_06, **Tabela 1**) e controle sem mutações na via *RAS/RAF*. A resposta ao tratamento com os fármacos foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular utilizando cinco concentrações de cada droga (**Figura 2**). Os dados indicam que o tratamento com selumetinib resultou em redução da viabilidade celular nas concentrações de 1 µM, 0,1 µM e 0,01 µM, enquanto trametinib demonstrou efeito em todas as concentrações testadas.

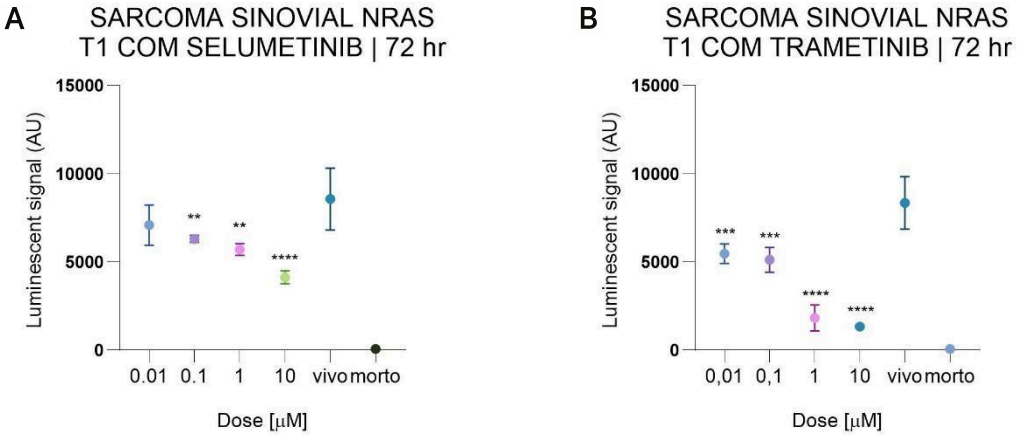

Figura 2: Ensaio de viabilidade celular após 72h do primeiro tratamento (T1) com Selumetinib (**A**) e Trametinib (**B**) em esferoides de sarcoma sinovial com mutação em *NRAS*. Controle vivo 0,2% DMSO, controle morto 25% DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. $R^2 = 0,9339$ (A) e $R^2 = 0,9483$ (B). Os valores de significância representados no gráfico referem-se à comparação entre viabilidade celular de cada dose com o grupo controle vivo.

A partir desses resultados, foi calculado o valor de IC50 para ambas as drogas, sendo 5,608 µM para o Selumetinib e 3,029 µM para o Trametinib. Em seguida, foi realizado o segundo teste de replicata biológica (**Figura 3**), com três doses: IC50, IC50×3 e IC50/3. Assim, para Selumetinib, foram testadas as concentrações de 5,608 µM, 16,824 µM e 1,869 µM; e para Trametinib, 3,029 µM, 9,087 µM e 1,010 µM.

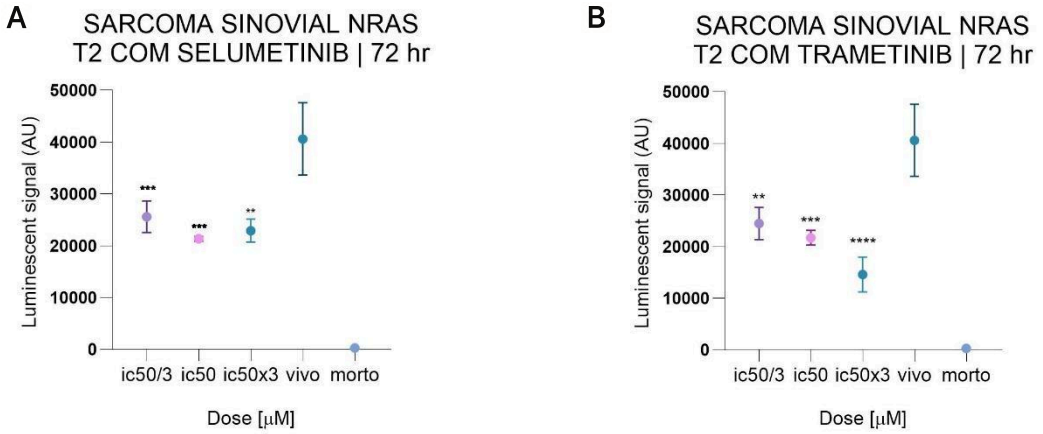

Figura 3: Ensaio de viabilidade celular após 72h do segundo tratamento (T2) com Selumetinib (A) e Trametinib (B) em esferoides de sarcoma sinovial com mutação em *NRAS* com concentrações calculadas a partir do IC50 = 5,608 (selumetinib IC50 = 0,3029 (trametinib). Controle vivo 0,2% DMSO, controle morto 25% DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. $R^2 = 0,9517$ (A) e $R^2 = 0,9473$ (B). Os valores de significância representados no gráfico referem-se à comparação entre viabilidade celular de cada dose com o grupo controle vivo.

O mesmo protocolo foi utilizado para o teste dos fármacos em uma amostra controle, mesmo tipo tumoral - sarcoma sinovial - porém sem mutações em genes da via *RAS/RAF*. Tanto para selumetinib quanto para trametinib, todas as doses testadas tiveram efeito (**Figura 4**).

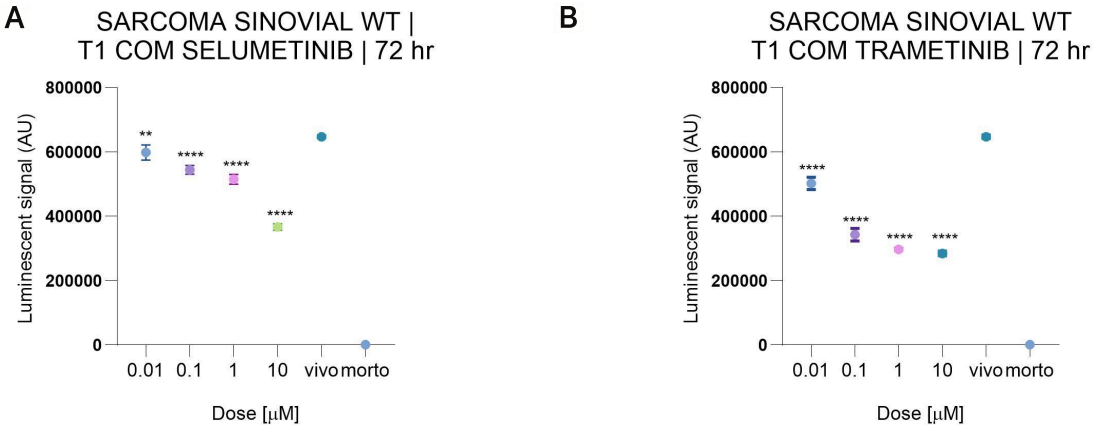

Figura 4: Ensaio de viabilidade celular após 72h do primeiro tratamento (T1) com Selumetinib (A) e Trametinib (B) em esferoides de sarcoma sinovial *wild-type* (WT). Controle vivo 0,2% DMSO, controle morto 25% DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. $R^2 = 0,9817$ (A) e $R^2 = 0,9802$ (B). Os valores de significância representados no gráfico referem-se à comparação entre viabilidade celular de cada dose com o grupo controle vivo.

Da mesma forma, foram determinados os valores de IC50, sendo 3,153 µM para selumetinib e 0,002205 µM para trametinib. Ambos os valores são inferiores aos observados nos testes com mutação, indicando que foram necessárias concentrações menores dos fármacos para reduzir em 50% a viabilidade celular no teste controle. Esses valores sugerem que os medicamentos tiveram efeitos menos significativos nos

modelos com mutação em comparação aos modelos selvagem. O segundo tratamento também foi realizado nos esferoides sem mutação, com os valores de IC50, IC50×3 e IC50/3 (**Figura 5**).

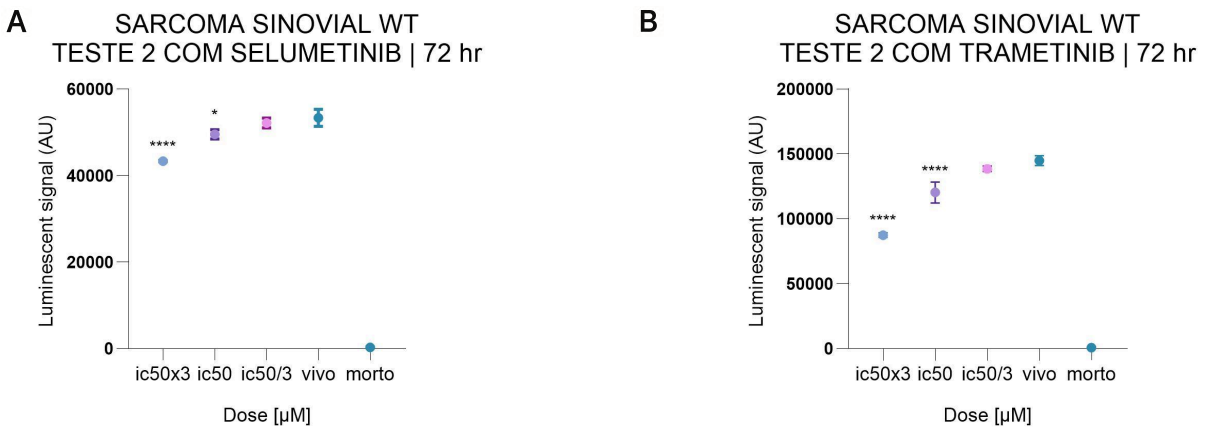

Figura 5: Ensaio de viabilidade celular após 72h do segundo tratamento (T2) com Selumetinib(A) e Trametinib (B) em esferoides de sarcoma sinovial *wild-type* (WT). Controle vivo 0,2% DMSO, controle morto 25% DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. $R^2 = 0,9814$ (A) e $R^2 = 0,9747$ (B). Os valores de significância representados no gráfico referem-se à comparação entre viabilidade celular de cada dose com o grupo controle vivo.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento demonstram que os fármacos selecionados para o estudo foram eficazes para a amostra de sarcoma sinovial com mutação *NRAS*. Ainda, as amostras selecionadas como controle, sem mutações na via de interesse, também responderam ao tratamento com os medicamentos. Isto sugere que o parâmetro analisado para este tumor - ausência ou presença de mutação em *NRAS* - pode não refletir toda a complexidade da regulação da via de sinalização, indicando que abordagens complementares, como a avaliação da ativação da via por expressão gênica, serão necessárias para melhor compreender os mecanismos envolvidos.

BIBLIOGRAFIA

ENTAZ BAHAR, Md; KIM, Hyun Joon; KIM, Deok Ryong. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, [s.l.], v. 8, n. 1, 18 dez. 2023.

MANSINHO, André; FERNANDES, Ricardo Miguel; CARNEIRO, António Vaz. Histology-agnostic drugs: a paradigm shift—A narrative review. *Advances in Therapy*, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 1379–1392, 2022.

SANTOS, S. S. dos et al. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Research and development landscape for childhood cancer*. [s.l.]: World Health Organization, 2023.

YAEGER, R.; CORCORAN, R. B. Targeting alterations in the RAF–MEK pathway. *Cancer Discovery*, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 329–341, 1 mar. 2019.