



Projeto de Pesquisa

Efeitos do sistema 4-sulphonic-calix[6]arene sobre marcadores de células-tronco neoplásicas em três linhagens celulares de carcinoma mamário humano

Aluna: Isabela Bruno Allegretti (FCF Unicamp)

Orientador: André Almeida Schenka (FCM Unicamp)

Colaboradora: Valéria Barbosa de Souza (FCM Unicamp)

Introdução

Os tumores são tecidos anômalos que se originam a partir de uma única célula-tronco chamadas de células-tronco tumoral (CTT) que sofreu alterações genéticas e/ou epigenéticas cumulativas, ocasionando interferências nos mecanismos de controle do crescimento, sobrevivência ou diferenciação celular. Assim, pode-se dizer que o câncer se constitui tipicamente de clones celulares anormais que, a princípio, preservam algumas características fenotípicas e morfológicas de um dado tecido normal. (Liu, *et al.* 2010; Valent, *et al.* 2012; Dawood *et al.*, 2014). A grande questão é que as células-tronco tumorais são, na maioria dos casos, pouco responsivas aos tratamentos em relação ao restante de massa celular tumoral que elas dão origem. Como resultado, o tumor que inicialmente parece ser eliminado por quimioterapia e/ou radioterapia, reaparece após um certo período como resultado da resistência das CTTs. Além desta insensibilidade aos tratamentos convencionais, acredita-se que as contínuas mudanças genéticas e epigenéticas conferem também um novo tipo de resistência a tratamentos farmacológicos que é transmitida para as gerações de células-filhas geradas. (Campbell, *et al.* 2007; Moitra, *et al.* 2011; Valent, *et al.* 2012; Nassar, *et al.* 2016). A presença de tumorais em um tecido pode ser detectada a partir de biomarcadores geralmente encontrados na superfície celular. Uma infinidade deles pode ser identificada através de técnicas experimentais (e.g., imuno-histoquímica e imunofenotipagem por citometria de fluxo) e dentre estes marcadores, destacam-se: CD44, CD24, ALDH1, ABCG2, CD133 e Ki-67. Essas moléculas geralmente pertencem a classes de glicoproteínas de superfície, proteínas transportadoras ou até mesmo enzimas que possuem relação direta com diferenciação, adesão e sinalização celular e podem interferir no desenvolvimento das células, incluindo as células-tronco tumorais (Tume, *et al.* 2016; Li, *et al.* 2017). O câncer de mama é o tipo de tumor que mais atinge o sexo feminino no mundo, inclusive no Brasil, ficando atrás apenas do câncer de pele do tipo não melanoma (INCA, 2019).

A doxorrubicina, um fármaco bastante utilizado no tratamento do câncer de mama e outros tipos de tumores malignos, é conhecida por se ligar a enzimas associadas ao DNA celular, causando danos irreversíveis e destruição das células. Essa molécula também interfere na ativação de diversos mecanismos de sinalização celular capazes de induzir a apoptose (mecanismo de morte celular) tanto de células saudáveis como cancerígenas (Tacar *et al.*, 2018). O desenvolvimento de novas terapias têm se concentrado no uso de

nanopartículas ou compostos ditos como hospedeiros que atuem como transportadores ou como vetores magnéticos tendo como alvo as células tumorais ou as CTTs. O principal objetivo é melhorar o transporte de drogas em direção ao seu alvo terapêutico e, simultaneamente, diminuir seus efeitos colaterais (Ostos, *et al.* 2017). Dentre essas nanoestruturas, os lipossomas são provavelmente os nanovetores mais estudados como sistema de *drug delivery* de doxorrubicina (Vejpongsa, *et al.* 2014). Outra classe de nanoestruturas são os calixarenos ou calix (o 4-sulphonic-calix[6]arene é um exemplo), chamados de sistemas hospedeiro-convidado, que apresentam cavidades hidrofóbicas podendo carrear moléculas pequenas ou íons. Eles são oligômeros cíclicos baseado em um produto de hidroxialquilação de um aldeído e um fenol, resultando em cavidades feitas de várias unidades fenólicas ligadas via grupos metileno (Baldini, *et al.* 2007). Ao considerar que as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas dos calixarenos podem ser sistematicamente variadas, os efeitos que essas diferentes estruturas de calix produzem sobre qualquer droga podem e estão sendo investigados.

Metodologia experimental

Etapa 1: Caracterização do Calixareno usando a ressonância magnética (RNM)

Utilizou-se a técnica de ressonância nuclear magnética (colaboração com o LNano utilizando a *facility* do *Brazilian Bioscience National Laboratory*, CNPEM) do composto 4-sulphonic-calix[6]arene a fim de elucidar e confirmar sua estrutura química. Equipamento: espectrômetro 500 MHz Varian Inova. Solvente: D₂O.

Etapa 2: Determinar a concentração máxima de calixareno isolado ou associado capaz de inibir 50% da proliferação celular (IC_{50}) em linhagens de carcinoma mamário humano.

O primeiro passo foi a realização do cultivo celular das linhagens celulares humanas MCF-7, MACL-1 e MGSO-3 em frascos de cultura celular até atingirem de 70 a 80% de confluência (frascos de cultivo de 75 cm³ contendo RPMI 1640 ou DMEN complementados com 10% de soro fetal bovino, 2% de Glutamax, 1% de Piruvato de sódio e 0,2% de Pen Strep. Atmosfera umidificada, a 37°C, com CO₂ a 5%)

O segundo procedimento foi a realização dos ensaios de citotoxicidade utilizando o teste de redução do metil tetrazólio (MTT), seguindo o protocolo de Mossmann (1983). Cada linhagem celular foi distribuída em placas de 96 poços sendo MCF-7, 10.000 células/poço e MACL-1 e MGSO-3, 7.000 células/poço. Cada linhagem foi tratada com calixareno isolado e em combinação nas concentrações de 100-0,0001ug/mL (100ul/poço), sendo a doxorrubicina o controle positivo. Após 72 horas de incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foi adicionado 5mg/mL do reagente MTT. As placas foram incubadas por 4 horas a 37°C. Depois, as placas foram novamente centrifugadas, o sobrenadante removido, e os cristais de formazan dissolvidos em 150uL de álcool isopropílico. Mediu-se, então, a absorbância na leitora de placas SpectraMax 340 PC 384 (Molecular Device, 1311 Orleans Drive Sunnyvale, CA 94089) a 570 nm. O experimento foi realizado em quintuplicatas, dois experimentos independentes.

O terceiro procedimento consistiu em dispor cada linhagem celular em frascos de 25cm² realizando tratamentos com calixareno, calixareno+doxorrubicina e doxorrubicina nas respectivas doses de IC₅₀ conferidas no procedimento 2, além do controle. Os procedimentos foram realizados em dois experimentos independentes, para cada linhagem/fármaco. Após 72 horas, as células foram colhidas e centrifugadas. Foram adicionadas 3

gotas de plasma canino, 3 gotas de tromboplastina e 3 gotas de cloreto de cálcio. Os coágulos formados foram então encaminhados para fixação em formalina 10% tamponada, processamento citológico e inclusão em parafina (processo de cell block).

Etapa 3: Avaliar a expressão dos marcadores de CTTs, ALDH1 e CD133 nas linhagens celulares estudadas

Os monomarcadores de CTT utilizados foram: o anti-CD133 (monoclonal, ab19898, anti-hu, 1:100, ABCAM) e anti-ALDH1 (monoclonal, EP1932Y, anti-hu, 1:100, Epitomics). Cortes de 4-5 μm feitos a partir dos blocos de parafina dos *cell blocks* foram desparafinizados, submetidos ao protocolo de recuperação antigênica e lavados em água destilada. As amostras foram incubadas com anticorpo *overnight* e, posteriormente, incubadas com o sistema de revelação NovoLink™ Max Polymer Detection System. Os controles negativos foram as amostras de células com omissão do anticorpo primário. Os controles positivos foram aqueles adequados para cada marcador. A detecção e captura de imagem das colorações citológicas foram realizadas em regiões de *hotspot* utilizando um microscópio Nikon Eclipse 50i acoplado a uma câmera CMOS de 5Mpx da marca Motic. As quantificações foram feitas pelo software Image J (NIH, USA).

Resultados

Através da espectrometria de ressonância magnética nuclear, foi possível evidenciar a estrutura da molécula carreadora 4-sulphonic-calix[6]arene. Na análise de carbono 13, observou-se a presença de quatro espécies magnéticas de carbono na molécula: carbono que realiza a ligação entre dois anéis aromáticos (1), carbonos dos anéis aromáticos ligados à um átomo de oxigênio (2), carbonos dos anéis aromáticos ligados apenas aos demais carbonos do anel e hidrogênios e próximos de grupos hidroxilas (3), carbonos dos anéis aromáticos ligados apenas aos demais carbonos do anel e hidrogênios e próximos de grupos sulfônicos (4) e carbonos dos anéis aromáticos ligados ao enxofre do grupamento sulfônico (5). Na análise de RMN de Hidrogênio 1, pode-se constatar a presença de dois tipos magnéticos de hidrogênio: aqueles que realizam ligações com átomos de carbono (A) e aqueles que fazem parte dos grupamentos hidroxila ou sulfônicos (B).

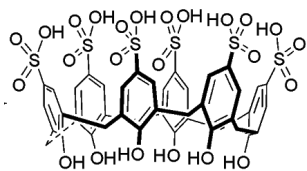


Figura 1. Estrutura do 4-sulphonic-calix[6]arene. Fonte: Latif Khan, Laboratório de Nanotoxicologia do CNPEM.

Figura 2. Estrutura do 4-sulphonic-calix[6]arene ilustrando os tipos de carbono e hidrogênio segundo a análise por RMN. Ilustração adaptada de www.chemicalbook.com

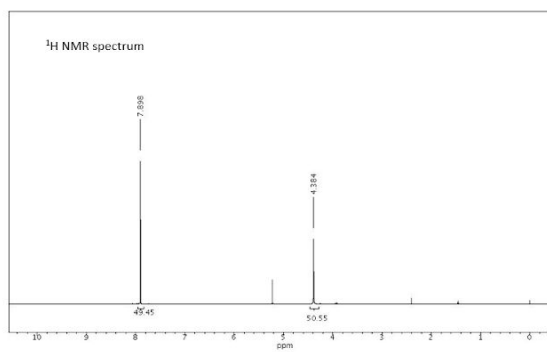
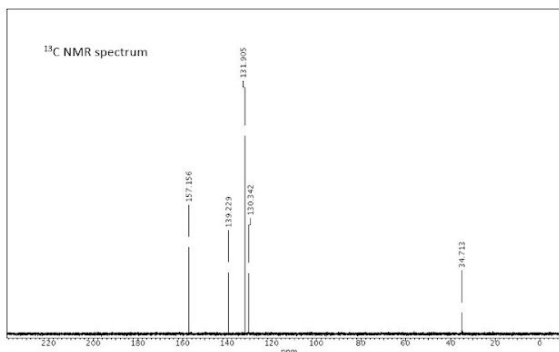
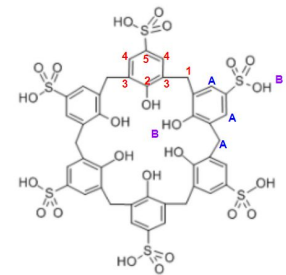


Figura 3. Espectros representativos de ^1H NMR e ^{13}C NMR do composto 4-Sulphonic-calix[6]arene. Espectrômetro 500 MHz Varian Inova, Brazilian Bioscience National Laboratory (LNBio).

As mensurações de viabilidade celular foram realizadas para estabelecer o efeito terapêutico do complexo Doxorubicina/calix quando comparado com a doxorubicina isolada. Observou-se que:

1. O calixareno isolado não afetou a viabilidade de nenhuma das linhagens celulares ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).
2. A adição de 1,6 mg de doxorubicina + 12,4 mg de calixarene (valor padronizado para solubilizar a doxorubicina sem utilizar o DMSO) causou redução na viabilidade celular que ficou abaixo de $0,5 \mu\text{g/mL}$ nas linhagens estudadas de forma significativa, diferente do calixareno isolado.
3. O efeito isolado de doxorubicina sobre a viabilidade foi significativo nas células MCF-7 e MGS03, e a combinação de doxorubicina + calix resultou na maior redução do crescimento de células tumorais na linhagem MGS03. Esse resultado mostra que em ensaios *in vitro*, o calix isolado possui baixa citotoxicidade e em combinação com a doxorubicina é capaz de reduzir a viabilidade celular mostrando um valor de IC_{50} próximo ou abaixo ao da doxorubicina.

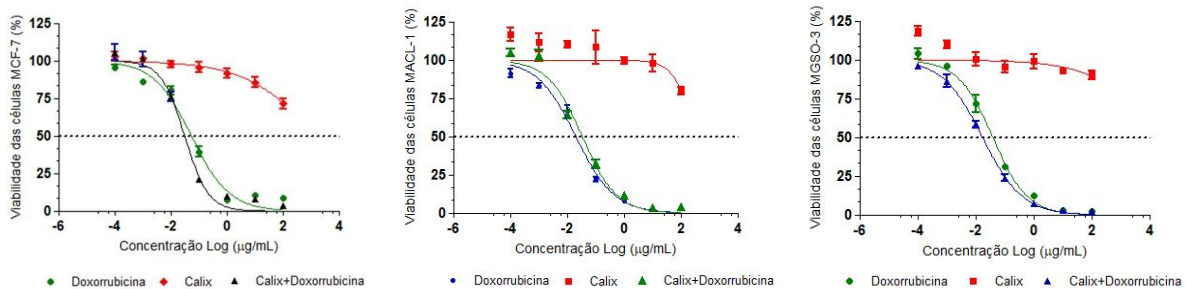


Figura 4. Curvas de dose-resposta dos tratamentos em linhagens de carcinoma mamário humano (MCF-7, MACL-1 e MGS0-3), após 72 horas.

Também foi observado o efeito da doxorubicina e da combinação com o calix após 30 dias mantido a 4°C para investigar o efeito dessa combinação após esse período e se o complexo mantém sua estabilidade e eficácia *in vitro*. A tabela a seguir mostra os valores de IC_{50} observados.

Tabela 1. Comparação dos valores de IC_{50} entre Doxorubicina isolada e o complexo (Doxorubicina+Calix) preparados no dia de uso e com 30 dias mantidos a -4°C .

	Tempo = 0 dia		Tempo = 30 dias	
	Doxorubicina	Doxorubicina + Calix	Doxorubicina	Doxorubicina + Calix
MCF-7	0,192	0,140	2,50	0,054
MACL-1	0,021	0,027	0,50	0,009
MGS0-3	0,169	0,017	0,17	0,020

Na Avaliação da expressão dos marcadores de CTTs, ALDH1 e CD133, observou-se que a administração de Calixareno isolado praticamente não afeta a positividade de ambos os marcadores, assim como observado no grupo controle. Já quando é feita a combinação do calixareno com a Doxorubicina há redução significativa da positividade tanto para ALDH1 quanto para CD133 nas três linhagens estudadas porém com menor

expressividade na linhagem MGSO-3. Comparada ao efeito da Doxorubicina isolada, a combinação dessas moléculas se mostrou mais efetiva sobre a positividade dos biomarcadores, resultado que indica ser um tratamento possivelmente efetivo sobre as CTTs.

Tabela 2. Percentual (%) e intensidade (I) de células MCF-7, MACL-1 e MGSO-3 positivas para os marcadores ALDH1A1 e CD133, após 72 horas de exposição, na concentração dos respectivos IC 50 de cada linhagem celular.

	ALDH1				CD133			
	Controle % (I)	Calixareno (CX) % (I)	Doxorrubicina (DX) % (I)	CX+DX % (I)	Controle % (I)	Calixareno (CX) % (I)	Doxorrubicina (DX) % (I)	CX+DX % (I)
MCF-7	100(+++)	100(+++)	90 (+/++)	60(+/++)	80(++/+++)	90(++)	90(++/+++)	70(++)
MGSO-3	100(+++)	100(+++)	90 (+/++)	90(+/++)	90 (+/++)	90 (+/++)	70(++)	80(++)
MACL-1	95(++/+++)	90(++)	80(++/+++)	50(++/+++)	90(+/++)	95(+/++)	80(+/++)	60(+/++)

Conclusão

O estudo da atividade anticâncer do calixareno combinado com doxorubicina é promissor, uma vez que este macrolídeo potencializou o efeito citotóxico da doxorubicina, em pelo menos duas linhagens celulares (MCF-7 e MGSO-3) e potencializou o efeito anti célula tronco tumoral em MCF-7 e MACL-1. Sugere-se a continuidade do estudo *in vivo* para avaliar os possíveis efeitos adversos, principalmente a cardiotoxicidade causada pelo uso da doxorubicina.

Referências

- Liu S, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *J Clin Oncol*, 2010. 28
- Valent P, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*, 2012. 12
- Dawood S, et al. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology Williston Park*, 2014. 12
- Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, 2007. 6
- Nimsea SB, Taisun K. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.*, 2013. 42
- Moitra K, Lou H, Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol & Ther.* 2011. 89
- Tume L, et al. CD133 in breast cancer cells and in breast cancer stem cells as another target for immunotherapy. *Gaceta Mexicana de oncologia*, 2016. 15
- Li, W. et al. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Scientific Reports*, 2017.
- Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Atlas da Mortalidade. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>.
- Tacar O, et al. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*, 2013. 65
- Ostos FJ, et al. P-Sulfocalix[6]arene as Nanocarrier for Controlled Delivery of Doxorubicin. *Chem. Asian Journal*, 2017. 12
- Veipongsa P, et al. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *J. of the American College of Cardiology*, 2014. 64
- Baldini L. et al. Calixarene-based multivalent ligands. *Chem. Soc. Rev.*, 2007. 36
- Sousa VB. Caracterização *in vitro* e *in vivo* de marcadores imunofenotípicos para células-tronco neoplásicas em linhagens celulares derivadas de carcinoma mamários humano. Universidade Estadual de Campinas, 2015
- Dany Nassar, Cedric Blanpain. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2016. 11