



Disrupção da resistência tumoral através de terapia direcionada a depleção de células tronco tumorais e espinocelulares de cabeça e pescoço.



Mariana R. Estevan, Pablo Agustin Vargas, Gabriell Borgato.

Resumo

Os carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (CECP) constituem um dos seis tumores malignos mais comuns no mundo. Seu tratamento, muitas vezes, é cirúrgico e invasivo gerando sequelas que podem diminuir drasticamente a qualidade de vida dos pacientes. A radioterapia também é utilizada e sabe-se que em região de cabeça e pescoço também gera consequências nos pacientes submetidos a esse tipo de tratamento. Podendo ser aplicada como terapia neo-adjuvante e adjuvante a radioterapia ou cirurgia existe a quimioterapia, que tem mostrado benefícios na sobrevida dos pacientes. Porém quando comparado a outros tipos de câncer, como leucemia infantil e doença de Hodgkin, a melhora do tratamento de CECP em estágio avançado com quimioterapia é modesta e a principal causa destas falhas está baseada na resistência tumoral aos quimioterápicos. Dentre os vários mecanismos de resistência a quimioterapia em CECP, vem sendo estudado (i) o papel das modificações epigenéticas como a acetilação de histonas, (ii) a ativação da via de sinalização do NFkB e a (iii) presença de células tronco tumorais (CTT). Achados prévios mostraram que o acúmulo de CTTs e a desatilação de histonas estão diretamente relacionados à ativação da via de resistência do NFkB. Subsequentemente descobriu-se que a acetilação farmacológica das histonas induz a redução do número de CTTs. Desta forma, foi proposto um novo regime farmacológico para os CECPs utilizando drogas capazes de interferir na expressão epigenética das células.

A Emetina é uma droga rotineiramente utilizada no tratamento de infecção por protozoário e, em baixas concentrações, inibe seletivamente a via de sinalização do NFkB. Desta forma, a Emetina é uma droga importante no entendimento da resistência tumoral e para criação de novos tratamentos para CECPs.

O projeto tem como objetivo determinar o impacto da inibição da fosforilação do Ikb α na manutenção de CTT de CECP e determinar a eficiência terapêutica combinada dos inibidores de HDAC e da inibição da fosforilação do Ikb α na depleção de CTT e sensibilização de CECP (Terapia de Sensitização) a Cisplatina.

Palavras-chave: Emetina, Células troncotumorais, Carcinomas espinocelulares.

Introdução

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) está entre as seis neoplasias malignas mais frequentes no mundo (Warnakulasuriya, 2010). Apesar das inovações em ciência básica, em pesquisa clínica e nos avanços significativos nas técnicas cirúrgicas e de radioterapia observados nos últimos anos, a taxa de sobrevida global é baixa, apenas 30 a 50% dos doentes estarão vivos após cinco anos da conclusão do tratamento oncológico (Curado, Hashibe 2009; Winn et al. 2015). Sabe-se que alguns tumores sólidos, assim como o CECP são compostos por subpopulações celulares, e entre elas há o grupo de células troncotumorais (CTTs). As CTTs constituem uma pequena subpopulação do tumor, e apresentam grande potencial proliferativo, capacidade de recidiva, ativação de quiescência celular, evasão da apoptose, resistência a dano de DNA, expressão anormal de proteínas envolvidas no transporte de drogas e potencial de desenvolver tumores in vivo (Prince et al. 2007; Vermeulen et al. 2012; Zhang et al. 2012; Adorno-Cruz et al. 2015; Islam et al. 2015). Esse subgrupo de células é, na maior parte dos casos, o responsável pela resistência tumoral, ocorrência de metástases e recidivas do tumor (Bertrand et al. 2014; Suh, Lee 2015).

O tratamento do CECP é complexo e envolve, na maioria das vezes, múltiplas modalidades de tratamento. As principais formas utilizadas são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Kaminagakura et al. 2010). A quimioterapia pode ser utilizada isoladamente ou em combinação com as demais formas de tratamento. O quimioterápico padrão utilizado é a Cisplatina (Vermorken, Specenier 2010) e que, apesar de mostrar resultados positivos, também mostra casos de insucessos ligados ao desenvolvimento de resistência tumoral (Kartalou, Essigmann 2001; Modur, Thomas-Robbins, Rao 2015) e desenvolvimento de tumores secundários (Modur, Thomas-Robbins, Rao 2015).

Vem sendo estudado que um dos fatores importantes na resistência das CTTs é a ativação da via do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) que tem sido relacionada com o desenvolvimento e progressão tumoral (Tamatani et al. 2001; Bindhu et al. 2006; Yan et al. 2008), na resistência ao tratamento quimioterápico (Arlt et al. 2002; Salvatore et al. 2005; Almeida et al. 2013) e radioterápico em tumores sólidos (Ahmed, Li et al. 2008; Tan et al. 2010), e na manutenção de células tronco tumorais.

Vários fármacos têm sido empregados na inibição da via do NFkB como é o caso do Bortezomib e do Velcade. Porém, vários efeitos adversos, tais como náuseas, diarreia, fadiga, hematoma, sangramentos, risco aumentado de infecções, constipação entre outros, são associados ao uso de inibidores da via do NFkB. Isso se dá, principalmente, pela falta de especificidade destas drogas. A Emetina demonstrou uma inibição seletiva sobre a fosforilação do Ikb α e têm-se mostrado a habilidade desta droga em induzir apoptose em carcinomas de ovário (Sun et al. 2015), leucemia (Moller et al. 2007), células pancreáticas (Han et al. 2014), além de induzir a parada do crescimento de células de câncer de bexiga (Foreman et al. 2014). Importaneamente, as doses

terapêuticas de Emetina utilizadas no tratamento de câncer são baixas e não foram relatados problemas com toxicidade (Mastrangelo et al. 1973). Resultados estes que mostram a segurança em usar Emetina no tratamento de câncer.

Assim como em vários outros tumores sólidos, a ativação de resistência tumoral tem sido observada em CECP, onde o tratamento quimioterápico a base de platina reduz de forma significativa o tumor, mas não atinge todos os subtipos celulares destes tumores policlonais, em especial a população de CTT. Deste modo, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam efetivamente atuar nos vários subtipos celulares presentes nos CECP. Para tanto, torna-se vital o desenvolvimento de terapias combinadas capazes de atingir células tumorais proliferativas assim como células tumorais quiescentes (CTT) (Al-Hajj et al. 2003; Song et al. 2010).

Resultados e Discussão

Para análise do efeito da Emetina sobre as células tumorais foi usada a citometria de fluxo. Os resultados obtidos (Gráficos 1 e 2) mostraram que a concentração de 250nM de Emetina foi a que exerceu maior efetividade na eliminação das células tumorais.

Após esta análise, foram realizados testes de imunofluorescência para verificar o efeito da droga sobre as moléculas H3K9ac (histona 3 lisina 9 acetilada) e p65. Os resultados (Imagem 1) mostraram que houve redução na expressão de H3K9ac e p65 nas culturas que foram submetidas ao tratamento com Emetina.

Frente a esses resultados é possível dizer que a Emetina possui efeito sobre as células troncotumorais, que apresentam alta expressão de H3K9ac e p65.

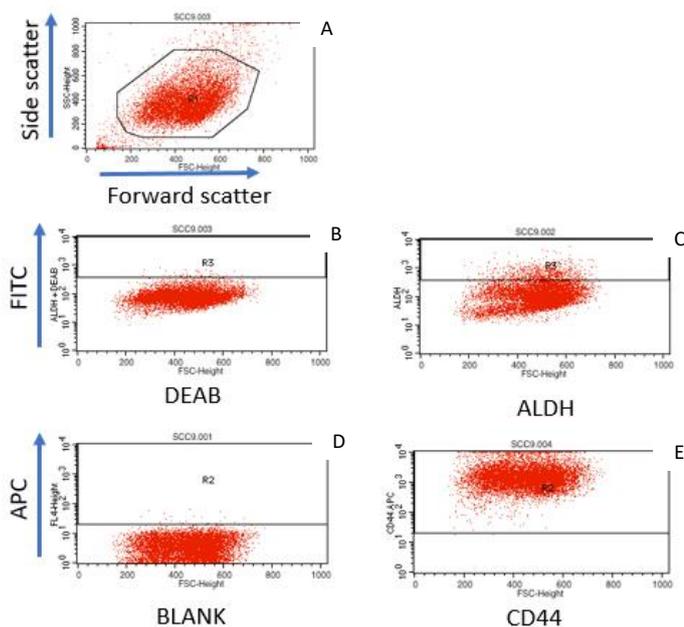


Gráfico 1. Resultados obtidos na citometria de fluxo. **A)**Análise das células viáveis. **B)**Controle ALDH. **C)**Análise da expressão de ALDH. **D)**Controle CD44. **E)**Análise da expressão de CD44.

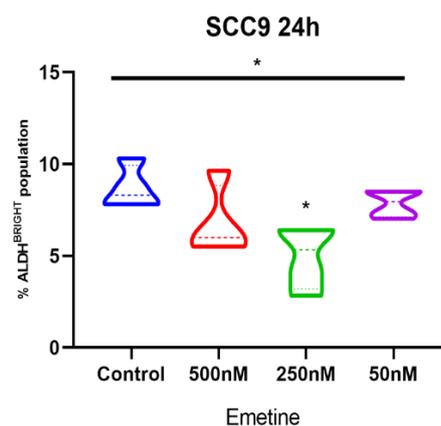


Gráfico 2. Expressão de ALDH decorrente da concentração de Emetina.

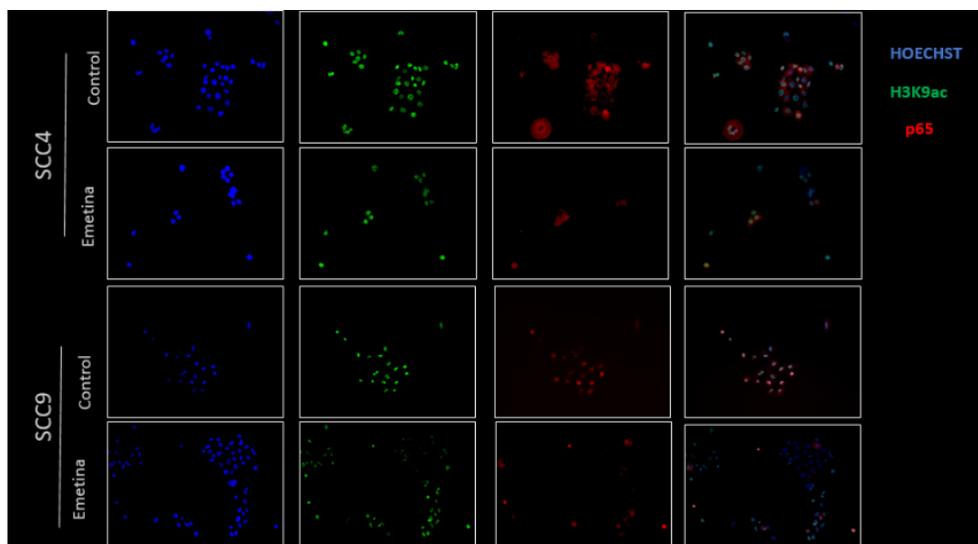


Imagem 1. Resultados obtidos na imunofluorescência com a Emetina na concentração de 250nM.

Conclusão

Os resultados obtidos até o momento permitem observar que a Emetina se mostra eficaz sobre as CTTs. Mais experimentos e análises são necessários para produção de novos conhecimentos a fim de se estabelecer novos tratamentos mais eficazes para carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço.

Observações

Devido a pandemia mundial do novo coronavírus-19 não foi possível concluir os testes e análises, o trabalho será retomado assim que possível.

Agradecimentos

Agradeço a FAPESP por promover a pesquisa e conceder uma bolsa de estudos. Processo FAPESP: 2019/14139-7.