

Projeto de Pesquisa

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

Isabela Bruno Allegretti ^a; Latif Ullah Khan ^b; Marcelo Knobel ^b; Valéria Barbosa de Souza ^c; André Almeida Schenka ^c

- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas.
- Laboratório Nacional de Nanotecnologia, CNPEM.
- Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Introdução

Os tumores são tecidos anômalos que se originam a partir de células-tronco tumorais (CTT), isto é, células-tronco adultas que sofreram alterações genéticas e epigenéticas cumulativas, ocasionando interferências nos mecanismos de controle do crescimento, sobrevivência e/ou diferenciação celular. Assim, pode-se dizer que o câncer constitui-se 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 CTTs 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 de mecanismos de resistência. Além desta questão, acredita-se que as contínuas mudanças genéticas 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 tumores 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 e CD133. 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 doxorubicina, 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 e compostos ditos como hospedeiros que atuam como transportadores ou como vetores magnéticos, tendo como alvo as células tumorais,

incluindo as CTTs. O principal objetivo de tais moléculas adjuvantes é o de melhorar o transporte de drogas antineoplásicas em direção ao seu alvo terapêutico e, simultaneamente, diminuir seus efeitos colaterais (Ostos, *et al.* 2017). Dentre essas nanoestruturas, os lipossomas são provavelmente os nanoveículos mais estudados como sistema de *drug delivery* de doxorrubicina (Vejpongsa, *et al.* 2014). Outra classe de nanoestruturas são os calixarenos (o 4-sulfocalix[6]areno é um exemplo) que apresentam cavidades hidrofóbicas podendo carrear moléculas pequenas ou íons. Eles são oligômeros cíclicos baseados 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 produzem sobre qualquer droga podem e devem ser 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 DMEM 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 a 0,0001 µg/mL (100 µl/poço), sendo a doxorrubicina o controle positivo. Após 72 horas de incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foi adicionado 5 mg/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 150 µL 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 25 cm² 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) e de proliferação celular (ki67) 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). O mono marcador de proliferação utilizado foi o Ki67 (monoclonal, MA5-14520 (SP6), anti-hu, Invitrogen) Cortes de 4-5 μm feitos a partir dos blocos de parafina dos *cell blocks* foram desparafinados, 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-Sulfocalix[6]areno. 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).

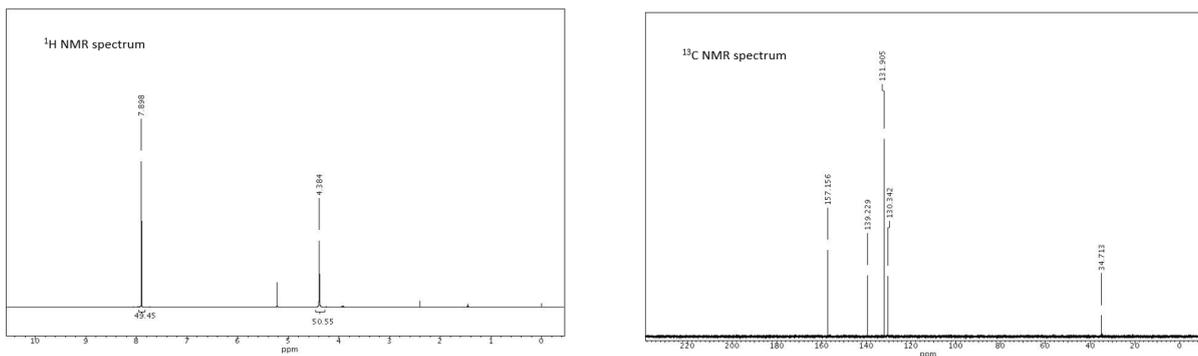


Figura 3. Espectros representativos de ¹H NMR e ¹³C NMR do composto 4-Sulfocalix[6]areno. Espectrômetro 500 MHz Varian Inova, Brazilian Bioscience National Laboratory (LNBio).

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 doxorrubicina + 12,4 mg de calixarene (valor padronizado para solubilizar a doxorrubicina sem utilizar o DMSO) causou redução na viabilidade celular que ficou abaixo de 0,5 µg/mL nas linhagens estudadas de forma significativa, diferente do calixareno isolado.

3. O efeito isolado de doxorrubicina sobre a viabilidade foi significativo nas células MCF-7 e MGSO3, e a combinação de doxorrubicina+calixareno resultou na maior redução do crescimento de células tumorais na linhagem MGSO3. Esse resultado mostra que em ensaios *in vitro*, o calix isolado possui baixa citotoxicidade e em combinação com a doxorrubicina é capaz de reduzir a viabilidade celular mostrando um valor de IC₅₀ próximo ou abaixo ao da doxorrubicina.

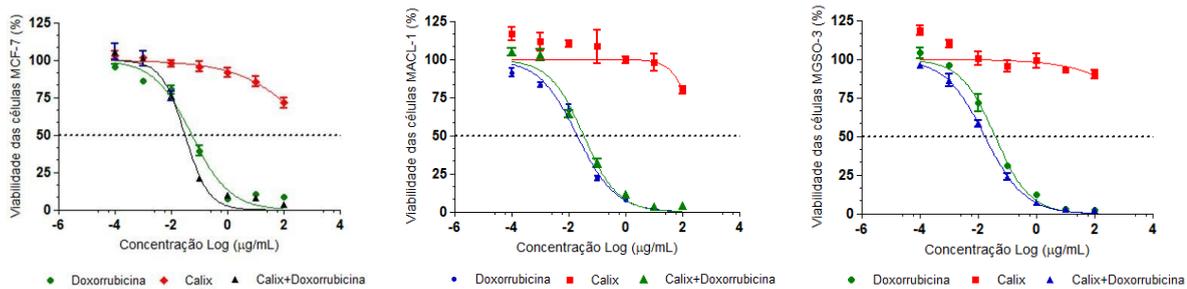


Figura 4. Curvas de dose-resposta dos tratamentos em linhagens de carcinoma mamário humano (MCF-7, MACL-1 e MGSO-3), após 72 horas.

Também foi observado o efeito da doxorrubicina 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 IC₅₀ observados.

Tabela 1. Comparação dos valores de IC₅₀ entre Doxorrubicina isolada e o complexo (Doxorrubicina+Calix) preparados no dia de uso e com 30 dias mantidos a -4°C.

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

Na avaliação da expressão dos marcadores de CTTs/de proliferação celular, 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 Doxorrubicina há redução significativa da positividade tanto para Ki67, como para ALDH1 e CD133 nas três linhagens estudadas, porém com menor expressividade na linhagem MGSO-3. Comparada ao efeito da Doxorrubicina isolada, a combinação dessas moléculas se mostrou mais efetiva sobre a positividade dos marcadores, 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, CD133 e Ki67, após 72 horas de exposição, na concentração dos respectivos IC₅₀ de cada linhagem celular.

		MCF-7	MACL-1	MGSO-3
ALDH1 (%)	Controle	100	95	100
	Calixarene	100	90	100
	Doxorrubicina	90	80	90
	Calixarene + Doxorrubicina	60	50	90
CD133 (%)	Controle	80	90	90
	Calixarene	90	95	90
	Doxorrubicina	90	80	70
	Calixarene + Doxorrubicina	70	60	80
Ki67 (%)	Controle	90	69	79
	Calixarene	70	65	79
	Doxorrubicina	28	45	68
	Calixarene + Doxorrubicina	38	51	60

Conclusão

O estudo da atividade anticâncer do calixareno combinado com doxorrubicina é promissor, uma vez que este macrolídeo potencializou o efeito citotóxico da doxorrubicina, 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 doxorrubicina.

Referências

- LIU S, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *J Clin Oncol*, v. 28, 2010.
- VALENT P, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, 2012.
- DAWOOD S, et al. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology Williston Park*, v. 12, 2014
- CAMPBELL LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, v. 6, 2007.
- NIMSEA SB, Taisun K. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, 2013.
- MOITRA, Lou H, Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol & Ther.*, v. 89, 2011.
- TUME L, et al. CD133 in breast cancer cells and in breast cancer stem cells as another target for immunotherapy. *Gaceta Mexicana de Oncologia*, v. 15, 2016.
- 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 do Câncer. Estatísticas de câncer. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>.
- TACAR O, et al. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm. Pharmacol.*, v. 65, 2013.
- OSTOS FJ, et al. P-Sulfocalix[6]arene as Nanocarrier for Controlled Delivery of Doxorubicin . *Chem. Asian Journal*, v. 12, 2017.
- VEJPONGSA P, et al. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *J. of the American College of Cardiology*, v. 64, 2014.
- BALDINI L, et al. Calixarene-based multivalent ligands. *Chem. Soc. Rev.*, v. 36, 2007.
- SOUZA 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
- NASSAR D, BLANPAIN C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 11, 2016.