

“Efeitos da sinvastatina sobre o perfil exometabolômico de 3 linhagens de carcinoma mamário humano: correlação com expressão de marcadores de célula-tronco tumoral”

Palavras-Chave: Metabolômica, Câncer de Mama, Célula-tronco tumoral

Autores:

Jônatas Piazza Pena – UNICAMP

Dra. Valéria Barbosa de Souza (co-orientadora) – UNICAMP

Dr. Fabio Neves dos Santos – UNICAMP

Prof. Dra. Ana Valeria C. Simionato - UNICAMP

Prof. Dr. André Almeida Schenka (orientador) - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As células-tronco tumorais (CTTs) são uma pequena subpopulação de células neoplásicas (em tumores sólidos e leucemias), com capacidade tumorigênica, ou seja, de originar uma nova neoplasia, com as mesmas características do tumor primário, quando implantadas em camundongos imunodeficientes. No tecido mamário, as CTTs são relevantes nos processos de iniciação, progressão e resistência terapêutica de neoplasias malignas, sendo consideradas, atualmente, como alvos terapêuticos de grande potencial. Estudos recentes mostram a sinvastatina, uma droga antilipídêmica, como uma estratégia terapêutica antineoplásica e anti-CTT bastante promissora, tendo em vista sua baixa toxicidade. A exometabolômica compreende um conjunto de técnicas que apresentam alto rendimento/desempenho (*high-throughput/high-content*) e que visam a detecção/quantificação de produtos finais resultantes da atividade metabólica da célula, secretados pelas células em estudo. A exometabolômica pode ser considerada uma técnica emergente e de grande utilidade em estudos fisiopatológicos e farmacológicos do câncer, uma vez que pode fornecer dados relevantes para o entendimento da fisiopatogênese de neoplasias malignas, mecanismo de ação de fármacos, bem como para o desenvolvimento de novos biomarcadores circulantes (diagnósticos, terapêuticos e toxicopatológicos). Desse modo, esta pesquisa teve como objetivo principal descrever possíveis ações da sinvastatina sobre o perfil exometabolômico de 3 linhagens de carcinoma mamário humano (MCF-7, MACL-1 e MGSO-3) e as alterações quantitativas em metabólitos específicos, após 24 horas de exposição à sinvastatina comparada com doxorrubicina (controle positivo).

OBJETIVOS:

1) Caracterizar o perfil exometabolômico basal das 3 linhagens celulares de câncer de mama utilizadas (MCF-7, MGSO-3 e MACL-1).

2) Descrever as modificações do perfil metabólico basal observadas 24h após um tratamento com sinvastatina na dose IC₂₅ (quais os metabólitos que sofrem modificações em sua quantidade e qual direção da alteração – i.e., aumento ou redução).

3) Estabelecer relações entre o papel biológico dos metabólitos mais relevantes (quando conhecido) e o provável mecanismo de ação antineoplásica/anti-CTT da sinvastatina.

A principal contribuição do trabalho é o conhecimento acerca do perfil exometabólico basal das linhagens (que poderá ser relevante para o desenvolvimento de biomarcadores circulantes diagnósticos do subtipo molecular de câncer mamário) e do mecanismo de ação antineoplásica/anti-CTT da sinvastatina no câncer de mama humano.

METODOLOGIA:

As primeiras etapas necessárias para o experimento já haviam sido feitas anteriormente, como:

(a) cultivo das 3 linhagens celulares (MCF-7, MACL-1 e MGSO3) em placas de 6 poços (3 experimentos independentes); (b) distribuição em grupos: 1. controle (só meio de cultura), 2. Doxorrubicina (IC₂₅), 3. Sinvastatina (IC₂₅) e 4. Doxorrubicina (IC₂₅) + Sinvastatina (IC₂₅); (c) 24h de exposição aos tratamentos e obtenção das amostras para a análise metabólica; (d) análise exometabólica preliminar (espectrogramas), anotação dos metabólitos e (e) análise estatística. Com essas etapas concluídas, nos concentramos em (1) caracterizar o perfil exometabólico basal das 3 linhagens celulares de câncer de mama utilizadas; (2) descrever quais metabólitos mostram-se alterados 24h após tratamento com sinvastatina na dose IC₂₅ e (3) realizar levantamento na plataforma PubChem para identificar a estrutura química, o nome do composto e o nome IUPAC (mais prováveis) dos metabólitos encontrados. Posteriormente fizemos um levantamento de artigos utilizando a plataforma PubMed, a fim de avaliar a relevância patológica e farmacológica dos metabólitos.

Anterior à pesquisa bibliográfica, foi feita análise dos principais metabólitos utilizando o software do Espectrômetro de Massa (programa *Qualitative Analysis B.07*; Analítica). Foi usado também o software MonaData Base (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/search>) para identificar os metabólitos, sua possível estrutura molecular, fórmula molecular, precursor (m/z), total exato de massa e, às vezes, o nome do composto. Com a estrutura molecular foi possível identificar, no PubChem, o composto similar, bem como confirmar sua estrutura molecular, o nome do metabólito, o nome IUPAC e a classificação do composto. A partir destes dados, fizemos uma intensa busca destes compostos no PubMed com ênfase em sua relação com o câncer de mama humano. Avaliamos cerca de 100 artigos para encontrar a relação destes metabólitos com o câncer de mama, incluindo aspectos fisiopatológicos e farmacológicos.

Nossa busca foi orientada para compreender a função biológica já descrita na literatura relativa a determinado metabólito, sua função (atividade) farmacológica e aplicação clínica (potencial ou confirmada). Alguns metabólitos que podemos citar como exemplo aqui são: o diclorobenzimidazol ribosídeo (nas linhagens MGSO-3, MACL-1), o composto O-Glicosil, a genisteína/isoflavona, a L-treonina e o xanteno (encontrados na linhagem MGSO-3), bem como a astaxantina e o 1,9-Dideoxiforskolin (relevantes na MACL-1). E, finalmente, fizemos uma busca na literatura para identificar a relação entre os metabólitos provenientes das células controle (sem fármaco) e tratadas, bem como o provável mecanismo de ação antineoplásica e anti-célula-tronco em modelos *in vitro* de carcinoma mamário humano (MCF-7, MACL-1 e MGSO3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A análise estatística permitiu caracterizar o perfil exometabolômico entre as 3 linhagens celulares estudadas. Foram obtidos dados univariados (*One-way* ANOVA seguida pelo teste *post-hoc* do “LSD de Fisher”) e multivariados (multivariada não supervisionada I e supervisionada II [PCA, PLS-DA, VIP]) através do programa estatístico metaboanalyst 3.0. Com os dados univariados foi possível identificar os seguintes metabólitos relevantes para a distinção entre as linhagens: M461T23_2, M245T25, M269T28 e M521T29. A linhagem celular MGSO-3 destacou-se por apresentar 4 metabólitos distintos das demais linhagens (MACL-1 e MCF-7). O M269T28 corresponde ao composto genisteína/isoflavona. As isoflavonas como a genisteína e a daidzeína, por exemplo, são encontradas em uma série de plantas, incluindo fava e soja, café e também em culturas celulares. A genisteína tem sido descrita como uma substância com vários efeitos antitumorais em diversos tipos de câncer, especialmente no câncer de mama e de próstata. Alguns estudos, *in vitro* e *in vivo*, mostram que a genisteína diminuiu as CTTs de mama, e também inibiu estas células, por meio da regulação negativa da via de sinalização Hedgehog-Gli1 (Fan *et al*, 2013). Outros trabalhos demonstraram uma redução na mamófera, na expressão de CD44+/CD24-/ESA+ e nas subpopulações de CD24+ em linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 (Prasad *et al*, 2016).

Outro metabólito identificado na linhagem celular sem tratamento, MGSO-3, foi a L-treonina (M118T0). A L-treonina, no entanto, apresenta relevância na função biológica e no mecanismo de ação anti-CTT no câncer de mama. O resíduo de treonina é suscetível a numerosas modificações pós-tradução. Entre os vários padrões de regulação pós-tradução, a fosforilação é reversivelmente controlada pelo equilíbrio de quinases e fosfatases (Sundaramoorthy *et al*, 2016). A principal forma de sinalização celular envolve a fosforilação reversível de proteínas em resíduos de tirosina, serina ou treonina. No entanto, os níveis de fosforilação alterados são encontrados em diversas doenças, incluindo câncer, tornando as cinases e fosfatases alvos das drogas (Shariati *et al*, 2019). Além de seu papel na síntese de proteínas, a treonina pode ser catabolizada enzimaticamente para produzir nucleotídeos, lipídios e outras macromoléculas (Garcia-mayea *et al*, 2020). A flexibilidade metabólica da treonina depende da atividade de três enzimas. Duas dessas enzimas, treonina aldolase e treonina desidratase, são citosólicas, enquanto a terceira, a treonina desidrogenase (TDH), é mitocondrial. O catabolismo de treonina mediado por TDH é interessante e um tanto único entre os aminoácidos com respeito a uma ampla variedade das vias biossintéticas para as quais contribui (Garcia-mayea *et al*, 2020).

As células-tronco apresentam baixo nível de treonina, que aumenta de maneira exacerbada durante a diferenciação. Por outro lado, os níveis de possíveis catabólitos de treonina, incluindo a acetil-CoA e a glicina, são elevados em células-tronco e diminuem drasticamente durante a diferenciação. Finalmente, estudos com células cancerosas humanas revelaram que a proliferação celular é impulsionada pelo consumo de glicina e conversão de glicina para C1-THF, por meio de um sistema de clivagem de glicina para a síntese de nucleotídeo. Assim, a treonina é um combustível metabólico de alta eficiência usado por células e animais. O catabolismo de treonina mediado por TDH pode servir como um atalho metabólico para produzir biossintéticos limitantes do crescimento de construção de lipídios e nucleotídeos. Além dos papéis muito importantes que a treonina e os catabólitos realizam no metabolismo celular, torna-se claro que essas mesmas moléculas são capazes de influenciar o status epigenético celular, como substratos doadores para metilação e acetilação de histonas. Essas observações em células-tronco embrionárias (mESCs) devem estimular uma nova área de pesquisa sobre o efeito do metabolismo de aminoácidos nas propriedades principais das células-tronco, autorrenovação e diferenciação.

Com relação a análise multivariada encontramos os seguintes metabólitos distintos: (a) MGSO-3: M185T19 e M118T0 e (b) MACL-1: M185T17, M597T11 e M437T22. Os três metabólitos com maiores valores *VIP* estão

presentes em quantidade mais elevada na linhagem MGSO3 (os demais ocorrem em maior quantidade na MACL-1). Em células MACL-1 (sem tratamento), o metabólito M597T11, identificado como *Astaxantina* (AST), refere-se a um produto feito de organismos marinhos usado como suplemento anticâncer. De acordo com dados da literatura, o AST reduziu a expressão da pontina e induziu a apoptose em SKBR3, uma linhagem celular de câncer de mama. Ahn *et al.* (2020) relatam em seus estudos que a concentração aumentada de AST contribuiu para a redução expressiva de pontina, mutp53, Oct4 e Nanog. Isso indica que AST poderia regular os genes relacionados ao fenótipo CTT em células T47D e BT20 (Ahn *et al.*, 2020).

Análises uni e multivariadas também foram feitas para avaliar/descrever modificações no perfil exometabolômico após tratamento (com Sinvastatina, Doxorubicina e com a combinação DX+SNV) para cada linhagem celular. Apesar de a linhagem MACL-1 apresentar 15 metabólitos de maior capacidade discriminante, apenas 3 metabólitos tiveram VIP > 1, sendo considerados, neste caso, metabólitos mais influentes. O metabólito com maior valor VIP (M225T5) coincidiu com o único metabólito significativo na segunda análise univariada. Este metabólito encontra-se em quantidade máxima no grupo controle. O M225T5 corresponde a um ácido graxo de cadeia longa chamado de “miristoleato”, segundo as plataformas PubChem e PubMed. Este metabólito, portanto, não tem nenhuma relação com células-tronco em câncer de mama. As células MACL-1 tratadas com doxorubicina produziram o metabólito M673T5 que corresponde a proteína morfogenética óssea (HBMP). Alguns trabalhos relatam que a proteína HBMP-2/BMP-2 poderia facilitar a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e promover a motilidade e invasão de células de câncer de mama *in vitro* e em modelo de xenoinxerto de camundongo (Huang *et al.*, 2017). Recentes estudos relatam que a via de HBMP-2 pode ser ativada pela exposição a poluentes e contribui para a transformação das células-tronco e o início do câncer de mama. No entanto, os mecanismos pelos quais HBMP-2 promove EMT e metástase de câncer de mama, e sua relação com o desenvolvimento de CTTs, permanecem amplamente desconhecidos.

Na linhagem celular MCF-7 não foram identificados metabólitos com diferenças significantes quando comparamos controles e tratados. Na linhagem MGSO-3, verificou-se a ocorrência de apenas um metabólito (M438T21) obtido na análise univariada (One-way ANOVA seguida do LSD de Fisher). Esta análise permitiu a diferenciação do grupo doxorubicina+sinvastatina (DX+SNV) em relação aos demais grupos. Contudo, não foi possível a discriminação dos demais grupos experimentais entre si. O metabólito M438T21 foi identificado como uma benzenesulfonamida. A benzessulfonamida é um inibidor de anidrase carbônica (CA) humana B. Os derivados deste inibidor são eficazes no tratamento de doenças proliferativas, como o câncer. Este composto tem sido muito relatado na literatura como um possível candidato a produção de análogos para tratar o câncer, principalmente o câncer de mama, por ser um inibidor de anidrase carbônica humana, sendo estas superexpressas em células cancerosas como resposta adaptativa à hipóxia e condições ácidas características de muitos tumores. A hipóxia facilita a atividade de óxido-reductase específicas que podem ser exploradas para ativar seletivamente pró-drogas biorredutivas. Não foi encontrado, portanto, nenhuma relação com célula-tronco neoplásica de câncer de mama.

CONCLUSÕES:

1. Os principais compostos, ou seja, as substâncias mais influentes na diferenciação entre as linhagens foram as isoflavonas, o diclorobenzimidazol ribosídico, a astaxantina e a 1,9-dideoxiforscolina. Tais substâncias pertencem a classes diferentes e apresentam efeitos biológicos/farmacológicos pleiotrópicos. No entanto, todos possuem importância para o câncer de mama humano, com destaque na carcinogênese (em particular no controle do crescimento/proliferação celular).

2. Nos tratamentos farmacológicos, apenas um metabólito (M225T5), encontrado na MACL-1, permitiu a diferenciação entre grupo controle e os demais grupos tratados.
3. A substância benzenossulfonamida, observada no grupo “SNV+DX”/linhagem MGSO-3, possui relação com o câncer de mama humano, isto é, possui efeito citotóxico mediado pela inibição da anidrase carbônica e aplicação potencial no tratamento deste câncer.
4. As substâncias genisteína/isoflavona e L-treonina (MGSO-3 sem tratamento), astaxatina e HBMP-2 (MACL-1 sem tratamento) parecem estar relacionado com o fenótipo de célula-tronco tumoral em câncer de mama humano. Contudo, os dados encontrados na literatura ainda são muito preliminares para o estabelecimento de uma hipótese mais robusta a cerca do seu real papel na fisiopatogênese desses importantes alvos terapêuticos.

BIBLIOGRAFIA

- DANY NASSAR, Cedric Blanpain. *Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2016.
- CAMPBELL LL, Polyak K. *Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?* Cell Cycle, 2007.
- SOUSA VB, Schenka AA. *Cancer Stem and Progenitor-Like Cells as Pharmacological Targets in Breast Cancer Treatment*. Libertas Academica, 2015.
- TANAKA, Takuji *et al.* “Cancer chemoprevention by carotenoids.” *Molecules* (Basel, Switzerland), 2012.
- AHN, Yong Tae *et al.* “Astaxanthin Reduces Stemness Markers in BT20 and T47D Breast Cancer Stem Cells by Inhibiting Expression of Pontin and Mutant p53.” *Marine drugs*, 2020.
- GAO, Hua *et al.* “The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites.” *Cell*, 2012.
- BUJIS, J., van der Horst, G., van den Hoogen, C. *et al.* *The BMP2/7 heterodimer inhibits human breast cancer stem cell subpopulation and bone metastases formation*. *Oncogene*, 2012.
- HUANG, P., Chen, A., He, W. *et al.* *BMP-2 induces EMT and breast cancer stemness through Rb and CD44*. *Cell Death Discov.*, 2017.
- CHEN, Guohua, and Jian Wang. “Threonine metabolism and embryonic stem cell self-renewal.” *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 2014.
- SCHULENBURG, Axel *et al.* “Cancer stem cells in basic science and in translational oncology: can we translate into clinical application?.” *Journal of hematology & oncology*, 2015.
- GUPTA, Nidhi *et al.* *Phosphorylation of Sox2 at Threonine 116 is a Potential Marker to Identify a Subset of Breast Cancer Cells with High Tumorigenicity and Stem-Like Features*.” *Cancers*, 2018.
- FAN, P., Fan, S., Wang, H. *et al.* *Genistein decreases the breast cancer stem-like cell population through Hedgehog pathway*. *Stem Cell Res Ther* 4, 146, 2013.
- PRASAD R. Dandawate, Dharmalingam Subramaniam, Roy A. Jensen, Shrikant Anant. *Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy*. *Seminars in Cancer Biology*, 2016.
- SUNDARAMOORTHY Revathidevi, Arasambattu Kannan Munirajan. *Akt in cancer: Mediator and more*. *Seminars in Cancer Biology*, 2019.
- SHARIATI, Maryam, and Funda Meric-Bernstam. *Targeting AKT for cancer therapy*. *Expert opinion on investigational drugs*, 2019.
- GARCIA-MAYEA Y., C. Mir, F. Masson, R. Paciucci, M.E. Lleonart. *Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance*. *Seminars in Cancer Biology*, 2020.