UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CEILÂNDIA

CURSO DE FARMÁCIA

BRUNA FONTINELES DA CRUZ

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE UM INIBIDOR DE TELOMERASE PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

CEILÂNDIA, DF

2015

BRUNA FONTINELES DA CRUZ

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE UM INIBIDOR DE TELOMERASE PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia. Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

CELÂNDIA, DF

2015

BRUNA FONTINELES DA CRUZ

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE UM INIBIDOR DE TELOMERASE PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

_____

Prof. Dr. Rodrigo Haddad

_____

Prof. Dra. Graziella Anselmo Joanitti

CEILÂNDIA, DF

2015

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que de alguma maneira são afetadas pelo câncer, seja como paciente, seja amigos e família. E a todos que se dedicam a essa causa, que a vontade de ajudar ao próximo seja sempre maior que qualquer ganância financeira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo coração ao meu Deus amado, por ter me instruído em toda a graduação, cuidando de cada detalhe para que hoje eu possa estar aqui, na frente desse computador escrevendo as últimas palavras desse trabalho, para enfim começar uma nova etapa da minha vida profissional.

Agradeço à minha família em especial aos meus pais, pelo esforço em me criar e educar, sempre buscando o melhor para mim, participando ativamente da elaboração desta monografia, pois durante os dias que passei horas e horas dentro do meu quarto digitando, eram eles que traziam comida e qualquer coisa que eu precisasse até mesmo uma palavra amiga dizendo: calma Bruna! Está acabando. Obrigada por serem simplesmente os melhores pais do mundo. E agradeço as minhas irmãs por todo auxílio durante a graduação.

Agradeço a minha comunidade, Comunidade Católica Gratidão, por ajudar na minha formação ética e moral, ajudando a me tornar uma pessoa melhor aonde quer que eu esteja.

Agradeço aos meus amigos, aqueles que foram afetados pelas minhas oscilações de humor por causa deste trabalho, mas acima de tudo permaneceram comigo com paciência e oração. Obrigada Dê, Alan, Dani, Walliston, Joana, Regina, Bárbara, Luzia e Emily.

Agradeço a Isa, por me acompanhar em praticamente toda a graduação, agradeço pela amizade, pelas brigas, pelos conselhos, pelas séries assistidas, pelos sonhos de viagens compartilhados, mas principalmente por mostrar dia após dia que as dificuldades podem ser superadas e que a vida pode ser muito mais do que a gente conhece.

Agradeço ao pessoal do PIBIC, Guilherme, Jéssica, Ingrid, Karollyne e Tales, pois tudo ocorreu pelas mãos desse grupo competente e ao mesmo tempo divertido.

Agradeço ao meu orientador Diêgo, por toda paciência que teve comigo, por todas as explicações e ajuda. Agradeço principalmente por não ter pensamentos mesquinhos ao que tange o uso da ciência para o bem estar e saúde das pessoas.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a mim mesma, pois só eu sei todas as dificuldades enfrentadas na graduação até este momento de conclusão do curso de Farmácia.

“... Espera com paciência, dá ouvidos e acolhe as palavras de sabedoria; não te perturbes no tempo da infelicidade, sofre as demoras de Deus...” (Eclo 2,2-3) Bíblia Sagrada

Resumo

CRUZ, B. F. **Avaliação *in vitro* do potencial farmacológico de um inibidor de telomerase para o tratamento do câncer**. 2015. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Tratamentos alternativos para o câncer possibilitam não só avanços científicos e terapêuticos na medicina, mas representam também um alívio diante de uma doença tão temida pela humanidade. O presente estudo foi uma análise de diferentes linhagens de células tumorais quanto à expressão de telomerase, enzima responsável pela manutenção dos telômeros, e a partir disso foi observada a atuação do inibidor MST-312, que é um novo composto derivado de epigalocatequina galato, responsável por inibir a ação da telomerase. O método utilizado foi a categorização quanto à expressão de telomerase por meio da técnica de RT-PCR semi-quantitativa. A avaliação da atividade do inibidor foi feito por meio do tratamento de culturas de células com concentrações crescentes do mesmo por 80 horas, e posteriormente a avaliação da viabilidade celular por meio do teste MTT. Todos os dados foram submetidos a análises estatísticas adequadas. Como resultado a linhagem celular U251 (Glioblastoma) apresentou maior suscetibilidade ao MST-312, com IC50 igual a 2,03 µM, enquanto a linhagem HEK (Célula de rim embrionário imortalizado) obteve IC50 (concentração inibitória) igual 7,87 µM e a linhagem MDA (Câncer de mama) IC50 igual 16,21 µM. Curiosamente, de acordo com os tempos de duplicação encontrados, durante o tratamento a quantidade de células em culturas duplicaram 2,38; 2,04, e 3,31 vezes para células U251, HEK-293 e MDA-MB-231, respectivamente, o que não é suficiente para promover o encurtamento dos telômeros. Conclui-se então que o MST-312 inviabilizou a proliferação celular por uma via independente da inibição da telomerase. Assim, vemos que o MST-312 possui outras formas de atuação sobre a célula, além da já vista, inibição da telomerase.

Palavras-chave: Inibidor MST-312; Telomerase; telômero.

Abstract

CRUZ, B. F. ***In vitro* evaluation of the pharmacological potential of a telomerase inhibitor for the treatment of cancer.** 2015. Graduation Dissertation –Faculty of Ceilândia, University of Brasilia, Brasilia, 2015.

Alternative treatments for cancer would mean not only scientific and therapeutic advances in medicine, but a relief to humanity plagued by this disease. This study analyzed telomerase expression in different tumor cell lines, this enzyme is responsible for the maintenance of telomeres, and tested the actions of the telomerase inhibitor MST-312, which is a new epigallocatechin gallate derived compound. Expression of telomerase was confirmed by RT-PCR. Cell viability after 80 hours exposition of increasing concentrations of MST-312 was measured by MTT assay. The same assay was used to determine doubling time (DT) of each culture. The IC50 values calculated by nonlinear regression of the data were: 2,03 µM for U251 cells, 7,87 µM for HEK-293 cells and 16,21 µM for MDA-MB-231 cells. Interestingly, according to the DTs found, during treatment the amount of cells in cultures duplicated 2,38; 2,04, and 3,31 times for U251, HEK-293 and MDA-MB-231 respectively, what is not enough to promote shortening of telomeres. In conclusion, MST-312 exhibits cytotoxic action at high concentration through a mechanism not associated to telomerase inhibition.

Keywords: MST- 312, Telomerase, Telomera.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Dados epidemiológicos sobre tipos de câncer no Brasil..... 17

Figura 1. (b) Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo..... 17

Figura 2. Estrutura da telomerase 21

Figura 3. Estrutura química do MST-312 23

Figura 4. Presença de expressão da telomerase nas linhagens HEK – 293, U251 e MDA- MB – 231 28

Figura 5. (a) Atividade dose-dependente do MST-312 sobre as células de U251 29

Figura 5. (b) Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células U251..... 29

Figura 6. (a) Atividade dose-dependente do MST-312 sobre as células HEK - 293 30

Figura 6. (b) Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células HEK-293..... 30

Figura 7. (a) Atividade dose-dependente do MST-312 sobre as células de MDA..... 31

Figura 7. (b) Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células de MDA-MB-231..... 31

Figura 8. Regressão não linear do tempo de duplicação de U251..... 32

Figura 9. Regressão não linear do tempo de duplicação de HEK-293..... 32

Figura 10. Regressão não linear do tempo de duplicação de MDA.....33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Concentrações significativas quanto a viabilidade (P<0,05) 28

Quadro 2. Menor concentração tóxica das linhagens HEK – 293, U251 e MDA – MB – 231 31

Quadro 3. Tempo de duplicação das linhagens HEK – 293, U251 e MDA – MB – 231..... 33

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AAT Alongamento Alternativo de telômero.

BrT Bortezomib.

CO_2 Dióxido de Carbono.

DMSO Dimetilsulfóxido.

DNA Ácido Desoxirribonucléico

hTERT Transcriptase reversa da telomerase humana.

hTR RNA da telomerase humana.

IC50 Concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular.

INCA Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.

LCM Linfoma de células do manto.

LPA Leucemia Promielocítica Aguda.

MCT Cálculo mínimo de concentração tóxica.

mRNA RNA mensageiro.

MTT 3-(-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio

OMS Organização Mundial da Saúde.

p53 Supressor de tumor 53.

PCR Reação em cadeia de polimerase.

pRb Supressor de tumor retinoblastoma.

R^2 Razão dos quadrados das distâncias dos pontos para a linha.

RNA Ácido Ribonucléico.

SFB Soro Fetal Bovino.

TERC	Componente RNA da telomerase
TERT	Transcriptase reversa da telomerase.

SUMÁRIO

1 Introdução.....14
1.1 Câncer 14
1.2 Estimativas para o Câncer 16
1.3 Papel do telômero no processo oncológico.....18
1.4 Telomerase como alvo terapêutico 22
2 Justificativa 23
3 Objetivo 24
3.1 Objetivo Geral 24
3.2 Objetivo Específico 24
4 Metodologia..... 25
4.1 Cultura de células..... 25
4.2 Caracterização da expressão de telomerase..... 25
4.3 Avaliação de atividade tóxica do inibidor em células tumorais que expressam telomerase..... 26
4.4 Tempo de duplicação..... 26
4.5 Análise Estatística..... 27
5 Resultados 27
5.1 Caracterização da expressão de telomerase..... 27
5.2 Avaliação de atividade tóxica do inibidor em células tumorais que expressam telomerase..... 28
5.3 Tempo de duplicação..... 32
6 Discussão..... 33
7 Conclusões 33
8 Referências Bibliográficas 38

1 Introdução

1.1 Câncer

Neoplasia é *"Uma proliferação anormal do tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro*" (ROBBINS et al., 2012). A mais de 50 anos atrás foi descoberto que a capacidade proliferativa das células somáticas normais humanas é finita, contrapondo ao que ocorre com linhagens celulares derivadas de tumores, as quais possuem potencial ilimitado de crescimento (REDDEL, 2014).

Segundo o ABC do Câncer – abordagens básicas para o controle do câncer, do Ministério da Saúde, INCA, temos:

> "(...) A palavra câncer vem do grego karkínos, que quer dizer caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 a.C. O câncer não é uma doença nova. O fato de ter sido detectado em múmias egípcias comprova que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo. Atualmente, câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos. As células normais que formam os tecidos do corpo humano são capazes de se multiplicar por meio de um processo contínuo que é natural. A maioria das células normais cresce, multiplica-se e morre de maneira ordenada, porém, nem todas as células normais são iguais: algumas nunca se dividem, como os neurônios; outras – as células do tecido epitelial – dividem-se de forma rápida e contínua. Dessa forma, a proliferação celular não implica necessariamente presença de malignidade, podendo simplesmente responder a necessidades específicas do corpo" (INCA, 2012).

O câncer possui causas multifatoriais, (XIU et al., 2015) podendo estas serem externas ou internas ao organismo, porém, ainda assim inter-relacionadas. Ao que tange as causas externas estão: meio ambiente e hábitos próprios de um ambiente social e cultural, dentre as causas internas estão: mutações aleatórias e predisposições genéticas ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Ambos os fatores podem interagir e assim aumentar a probabilidade de transformações malignas nas células normais, porém, a suscetibilidade a alguma transformação maligna pode ser aumentada pelo processo de envelhecimento que leva a diversas alterações nas células. (INCA, 2013). Pode-se então dizer que diversos tipos de cânceres podem ser evitados ao se prevenir à exposição a fatores de risco comuns. Assim, ao se proceder com diagnósticos

precoces uma quantidade significativa de cânceres podem ser curados (WHO, 2013).

A característica de malignidade de todo câncer é a sua capacidade de invasão e metástase (ROBBINS et al., 2010a). O que torna o câncer potencialmente agressivo é a junção das características hereditárias das células cancerosas, sendo a primeira, a capacidade de reproduzirem-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular (STIVAROU & PATSAVOUDI, 2015), achados histopatológicos como anaplasias (ROBBINS et al., 2010a) e ainda a capacidade de invasão e colonização de regiões não próprias. Assim, o tumor se forma a partir da proliferação e crescimento anormal da célula, podendo originar tumores benignos quando a célula neoplásica não é invasiva e tumores malignos quando adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes (STIVAROU & PATSAVOUDI, 2015). Assim os tumores resultam da acumulação de mutações e modificações em genes ou mecanismos epigenéticos que levam a proliferação desenfreada (FEIJOO et al., 2014).

A capacidade de invasão das células malignas precede a metástase, as células malignas se desprendem e são carregadas pela corrente sanguínea e vasos linfáticos e formam tumores secundários em outros lugares do corpo, originando então as metástases, sendo esta a maior causa de óbito do paciente. Um tumor primário derivado da divisão celular de uma única célula pode sofrer alteração hereditária, assim irá ocorrer um acúmulo dessas alterações nos descendentes dessa célula, produzindo assim células com capacidade de proliferação e crescimento de forma desordenada. Por isso quando um tumor é descoberto, já há ali bilhões de células (STIVAROU & PATSAVOUDI, 2015).

Segundo ROBBINS e colaboradores, (ROBBINS et al., 2010b) o diagnóstico do câncer pode ser feito através de acompanhamento clínico e laboratorial, possuindo sinais e sintomas relacionados a localização e pressão sobre as estruturas adjacentes, atividade funcional alterada (síntese de substâncias), sangramento e infecções secundárias. Há ainda tumores que possuem sintomas constitucionais como anorexia, emagrecimento, astenia e febre, porém, manifestações como as dolorosas, infecciosas e psicológicas também são comumente encontradas (INCA, 2014). O câncer pode causar ainda uma perda

progressiva de gordura e de massa corporal, acompanhada por uma fraqueza profunda e anemia nos pacientes (DUVAL et al., 2010).

1.2 Estimativas para o câncer

O processo de industrialização vem trazendo consequências para a saúde de diversos brasileiros, bem como em outros países em desenvolvimento. O crescente aumento da exposição a agentes considerados agressivos a saúde, tem trazido a instauração de doenças crônico-degenerativas na população. Concomitantemente, as taxas de morbimortalidade do câncer vêm acompanhando esse crescimento (INCA, 2015a), e mesmo sendo uma doença muito antiga (DAVID & ZIMMERMAN, 2010), vem sendo tratada como uma epidemia no mundo desenvolvido (CAVALLI, 2009).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Estima-se que 7,6 milhões de pessoas morreram em 2008 devido a essa doença, podendo esse número duplicar até 2030 (SEKHRI, 2014). Este crescente aumento no número de novos casos de câncer na população, pode acarretar na insuficiência de recursos financeiros diante das necessidades de diagnóstico, tratamento e acompanhamento. Assim, é imprescindível a prevenção e o controle do câncer, o qual precisa adquirir o mesmo foco e a mesma atenção que a área de serviço assistencial, para assim evitar mortes que poderiam ser evitadas (BRASIL, 2014).

Em 2012 foram divulgados pela OMS informações importantes sobre o câncer. Entre elas, essa doença estaria entre as principais causas de morte no mundo, sendo a responsável por 8,2 milhões de mortes ocorridas naquele ano. A cada ano os cânceres de pulmão, fígado, estômago, colorretal e de mama são os que mais levam a óbitos, sendo que 30% das mortes por câncer são causadas pelos cinco principais riscos comportamentais e dietéticos, que são: índice de massa corporal elevado, baixa ingestão de frutas e legumes, falta de atividade física, tabagismo e uso de álcool. O uso do tabaco é o fator de risco mais importante para o câncer, causando mais de 20% das mortes por cânceres globais e cerca de 70% das mortes de câncer de pulmão. Há ainda, o câncer causado por infecções virais,

como HBV/HCV e HPV que são responsáveis por até 20% das mortes por câncer em países de baixa e média renda. Mais de 60% do total de casos novos anuais do mundo ocorrem na África, Ásia, América Central e América do Sul, sendo estas regiões responsáveis por 70% das mortes por câncer no mundo (WHO, 2014).

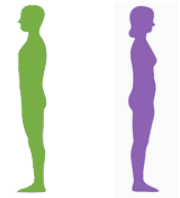
Segundo informações de 2014 (fig.1) do INCA, o câncer de próstata possui uma estimativa de 68.800 casos novos em homens, sendo que o único fator de risco bem estabelecido é a idade. Nas mulheres o tipo de câncer mais comum é o de mama, correspondendo a 25% de todo os tipos de câncer registrados (INCA, 2015a).

(a)

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	**203.930**	**208,77**	**51.100**	**241,30**	**190.520**	**187,13**	**58.710**	**248,46**
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	**302.350**	**309,53**	**70.750**	**334,08**	**274.230**	**269,35**	**81.250**	**343,85**

(b)

Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%
Estômago	12.870	4,3%
Cavidade Oral	11.280	3,7%
Esôfago	8.010	2,6%
Laringe	6.870	2,3%
Bexiga	6.750	2,2%
Leucemias	5.050	1,7%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%



Localização primária	casos novos	%
Mama Feminina	57.120	20,8%
Cólon e Reto	17.530	6,4%
Colo do Útero	15.590	5,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Estômago	7.520	2,7%
Corpo do Útero	5.900	2,2%
Ovário	5.680	2,1%
Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	4.320	1,6%

Fig.1: (a): Estimativas para o ano de 2014 de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária. (b): Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf. (Acessado em 8/06/2015 às 22:20h).

1.3 Papel dos telômeros no processo oncológico

Os telômeros são compostos por uma sequência específica de DNA especialmente rico em guaninas, não sendo, portanto genes, uma vez que não codificam proteínas. Nos seres humanos a sequência telomérica tem um comprimento que varia entre 10-15 quilo bases e possui sequências repetidas de 5'-TTAGGG-3', que interagem com proteínas específicas. A extremidade proximal dos telômeros humanos, a mais próxima do centrômero, também contém variações como, TTGGGG, TGAGGG e TCAGGG que são menos comuns no restante, isto é, a porção distal do telômero, que predominantemente contém repetições com substituições de bases nas posições 1 e 3, tal como GTAGGG e TTCGGG. Os terminais dos telômeros consistem de 25-200 nucleotídeos de cadeia simples de DNA (BASU et al., 2013; WANG et al., 2015; REDDEL, 2014; SANTAMBROGIO et al., 2014; FEIJOO et al., 2014).

Tetrahymena thermophila foi o primeiro organismo usado por Elizabeth Blackburn, renomada bióloga molecular estadunidense, e Joseph Gall, biólogo celular americano, para estudarem sobre os telômeros em 1978. Os telômeros são estruturas heterocromáticas especializadas de proteínas e DNA repetitivo, encontradas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos. Os trabalhos de Herman Müller e Barbara McClintock foram os primeiros a apoiar a existência de uma estrutura de proteção no final dos cromossomos quando observaram que cromossomos quebrados foram fundindo-se consigo mesmos, mas não com terminais naturais dos cromossomos, observando assim, a função de proteção dos telômeros. Além de conferir essa proteção de reparação do DNA deletério ou eventos de recombinação, os telômeros também mantêm a estabilidade cromossômica (FEIJOO et al., 2014).

As DNA's polimerases não possuem a capacidade de copiar linearmente todo o cromossomo de uma extremidade a outra, assim a replicação acaba por deixar uma pequena região na extremidade 3' dos cromossomos e diminuindo progressivamente as extremidades a cada ciclo de duplicação, assim, nas células somáticas normais, a cada divisão celular, ocorre o encurtamento dos telômeros. O telômero pode ser chamado de "relógio molecular", pois determina o número de

vezes que uma célula pode se dividir e ainda quando a senescência celular deve acontecer (TOLEDO et al., 2005).

Caso as extremidades do cromossomo se tornem desprotegidas, elas serão reconhecidas como quebra de cadeia dupla de DNA. Estes acontecimentos conduzirão as células normais a iniciarem um estado de mortalidade (M1). Se este processo for acompanhado por mutações em p53 (gene supressor de tumor 53) e / ou pRb (supressores de tumor retinoblastoma), as células continuarão a dividir e os telômeros se tornarão mais curtos. Neste ponto, as células poderão chegar a uma fase de mortalidade (M2) e serão caracterizadas por inúmeras aberrações, levando a apoptose. Células raras podem ocasionalmente escapar da crise M2 e se um mecanismo de manutenção dos telômeros é ativado eles continuam a proliferar, tornando-se imortais (ROMANIUK et al., 2014).

Em 1985, Greider, bióloga molecular estadunidense, e Blackburn conseguiram fazer a identificação de uma atividade enzimática "transferase terminal", capaz de estender sequências teloméricas. Esta atividade foi associada a um complexo de proteínas que foi chamado de telomerase. Em 1989, Morin identificou a atividade da telomerase em células humanas. Em 1994, Shay e Wright desenvolveram um simples ensaio baseado em PCR (reação em cadeia da polimerase), de repetição telomérica, melhorando a capacidade para detectar a atividade dos telômeros nas células humanas. A partir daí, uma série de pesquisas foram realizadas e em 2009 o Prêmio Nobel de fisiologia e medicina foi concedido a Elizabeth Blackburn, Jack Szostak, biólogo molecular britânico, e Carol Greider por suas descobertas sobre telômeros e telomerase (SEKHRI, 2014).

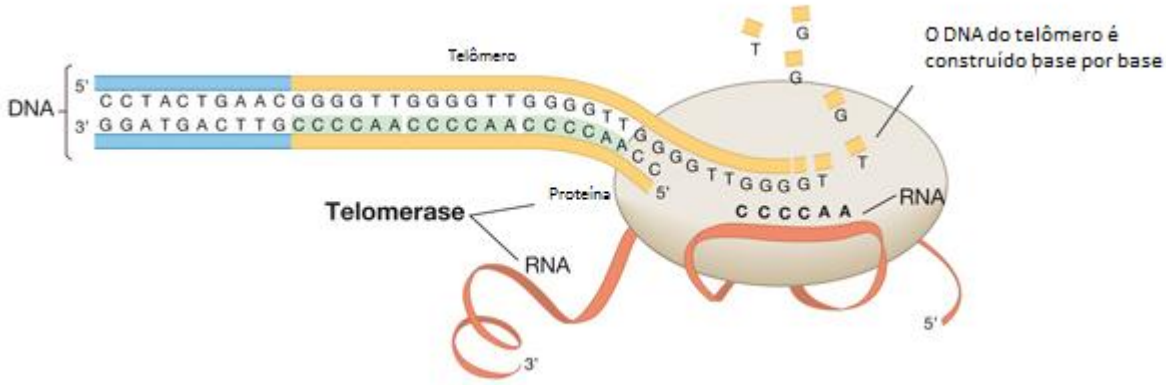
O tempo de vida proliferativa de células normais é limitado em grande parte pelo comprimento e a integridade dos seus telômeros. Estes atingem um comprimento criticamente curto resultando em instabilidade genética e subsequente apoptose. No entanto, no caso da proliferação contínua, as células com telômeros curtos escapam desse mecanismo de degradação dos telômeros ignorando o processo de envelhecimento celular e entrando em um novo ciclo de crescimento, através da ativação da telomerase, o que poderia imortalizar as células cancerosas (CREES et al., 2014; WANG et al., 2015; ELYSIA et al., 2012). Imortalização das células baseia-se então na reativação de um mecanismo de manutenção dos

telômeros para restaurar o comprimento dos telômeros, feito por meio da telomerase (DRASKOVIC I. & LONDONO-VALLEJOA, 2014). A característica mais estabelecida da imortalização, é que as linhagens celulares possuem capacidade de proliferar em cultura sem evidência de qualquer senescência ou de crise (HANAHAN &WEINBERG, 2011).

A Telomerase é uma ribonucleoproteína constituída de uma subunidade catalítica com ação de transcriptase reversa (TERT) e uma subunidade de RNA molde (TERC) (HU, 2013; SEKARAN et al., 2014).

A transcriptase reversa telomerase é, evolutivamente, uma enzima muito antiga. Têm sequências estruturais homólogas a outras tanscriptases reversa, tais como de retrovírus, retrotransposões, e etc. Ambos os componentes TERT e TERC são necessários e suficientes para a reconstituição da atividade catalítica da telomerase em condições livres de células. No entanto, para a correta manutenção do comprimento dos telômeros *in vivo* são necessárias proteínas associadas à telomerases adicionais. Um grande número de proteínas associadas à telomerase foi identificado em ciliados, leveduras e vertebrados sendo específicas para as respectivas espécies ou filos. Ambos os componentes da telomerase são associados com proteínas específicas. A expressão de TERT depende fortemente do tipo de células e tecidos do ambiente. A principal regulação da expressão TERT ocorre em nível de produção de muitos fatores de transcrição diferentes, que pode ser em parte, tecido específico (SARETZK, 2014).

O RNA de telomerase humana (hTR) é altamente estruturado com 451 nucleotídeos contendo vários domínios funcionais em adição a uma sequência de molde utilizadas de código para o DNA telomérico rico em guanina (fig. 2). A reativação da telomerase é necessária para a proliferação de células cancerosas. É ainda observado que a enzima telomerase é ativa em 80-90% de todas as células cancerosas isoladas de tumores humanos primários, mas está ausente em células vizinhas de tecido saudável (WANG et al., 2015; SEKARAN et al., 2014).


Telômero
DNA
5'
3'
C C T A C T G A A C G G G G T T G G G G T T G G G G T T

Desde o século XX a oncologia vem avançando e hoje há um maior entendimento sobre o câncer, tornando possível o avanço no desenvolvimento de técnicas para seu tratamento como, cirurgia, radioterapia, quimioterapia, medicina nuclear, imunoterapia entre outros (GIACOMINI, 2009). Para tanto a busca por novos alvos terapêuticos torna-se necessária, uma vez que os atuais tratamentos trazem grandes efeitos adversos ao paciente.

1.4 Telomerase como alvo terapêutico

Tem-se usado frequentemente a teoria de drogas alvo-específicas como abordagem no tratamento oncológico e assim temos visto frequentemente o estudo de terapias individualizadas com a esperança de melhorar os resultados e reduzir efeitos secundários (LEWIN & SIU, 2015).

O Bortezomib (BrT) é um inibidor de proteassoma com atividades pleiotrópicas. Um estudo avaliou os efeitos de BrT sobre a atividade da telomerase e sua regulação em Linfoma de células do manto (LCM). Os resultados mostraram que o BrT possui efeito citotóxico dose-dependente em duas linhagens celulares de LCM e demonstrou a capacidade do BrT para inibir a atividade da telomerase nessa linhagem, diminuindo a expressão de hTERT, de seu mRNA e a fosforilação da subunidade catalítica da hTERT por suas quinases (UZIEL et al., 2014).

Outro caso seria o dos análogos de nucleosídeos 6-tio-2'desoxiguanosina (6-tio-dG) que é reconhecido pela telomerase e incorporado dentro de novos telômeros sintetizados, levando a modificações de telômeros e disfunções dos mesmos, porém, apenas em células que expressam telomerase (MENDER et al., 2015).

Os oligonucleotídeos quimicamente modificados são pequenos oligonucleotídeos complementares aos RNAs alvo. Um estudo demonstrou o efeito de oligonucleotídeo antisense ligado ao 2-5A contra o hTR sobre a atividade da telomerase e a viabilidade celular em células de câncer do colo do útero. O oligonucleotídeo degradou eficazmente o hTR, inibiu a atividade da telomerase associada e diminuiu a viabilidade celular, demonstrando assim a capacidade de

induzir apoptose através da diminuição da estabilidade do RNA (YATABE et al., 2002).

Imetelstat de sódio é um 13-mer oligômero N3'-P5 'tiofosforoamidato, composto pela sequência 5'-TAGGGTTAGACAA-3 ', complementar com a região molde do componente de RNA da telomerase humana (hTR). Atua como um inibidor competitivo altamente específico e potente da telomerase. A presença de um grupo palmitoílo 5' torna o Imetelstat solúvel em lipídios, permitindo uma absorção celular eficiente. O tratamento *in vitro* de linhagens celulares de tumor com imetelstat resulta em encurtamento progressivo dos telômeros, levando a senescência celular ou apoptose. O tratamento *in vivo* com imetelstat em modelos de xenoenxerto resulta na inibição de tumores, crescimento e metástases. Imetelstat está atualmente em fase II de desenvolvimento clínico contra o câncer de mama, carcinoma de pulmão, mieloma múltiplo, e outros tipos de tumores (UZIEL & LAHAV, 2014; IMMANUAL et al., 2010).

O presente estudo irá tratar do inibidor MST- 312 (fig. 3) que é um novo derivado de epigalocatequina galato que é um extrato do chá verde. Ele atua inibindo a atividade da telomerase de uma maneira dose-dependente. O tratamento de algumas células com MST-312 mostrou uma disfunção do telômero, com o tratamento continuado houve o encurtamento progressivo dos telômeros e eventual redução de proliferação da célula (WANG et al., 2015).

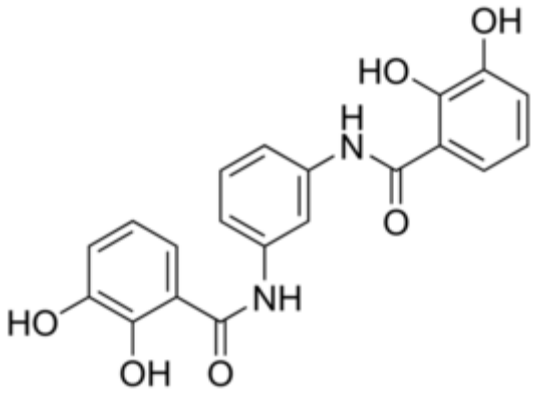


Fig.3: Estrutura química do MST-312. Fonte: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3949?lang=pt&region=BR. (Acessado em 02/07/2015 às 16:39h).

A chave de todas as questões relacionadas à telomerase reside na determinação dos tipos de tumores em que ocorre uma correlação clínica direta

entre a atividade da telomerase, o diagnóstico e prognóstico tumoral, permitindo assim que sejam utilizadas terapias inibidoras da telomerase como mais um recurso no combate ao câncer (TOLEDO et al., 2005).

2 Justificativa

No que concerne o ambiente científico, essa pesquisa possibilitará novos conhecimentos sore o MST-312, sua atuação em linhagens celulares sensíveis a ele, permitindo novos ramos de pesquisa na área oncologia, diante da atual necessidade de desenvolvimento de novas drogas.

A pesquisa contribuirá com informações úteis à manutenção e evolução dos conhecimentos sobre tratamentos para o câncer em um momento no qual essa doença vem ganhando maior relevância.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do estudo é a avaliação *in vitro* do potencial farmacológico do inibidor de telomerase MST- 312 para o tratamento do câncer.

3.2 Objetivo Específico

De modo a alcançar o objetivo geral pretendido, foram delineados os seguintes objetivos específicos para a pesquisa:

a) Caracterizar as linhagens celulares usadas quanto à expressão de telomerase.

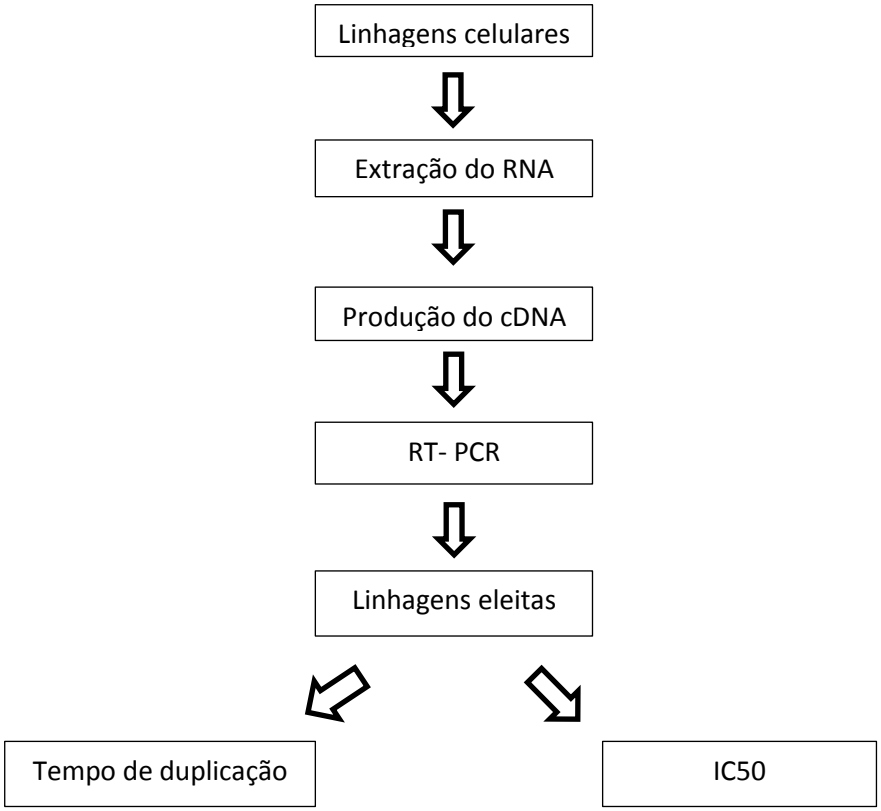
b) Determinar a IC50 (concentração inibitória) do inibidor de atividade de telomerase MST-312 em linhagens celulares telomerase positivas, identificando as mais susceptíveis ao tratamento.

c) Determinar o tempo de duplicação de cada uma das linhagens estudadas.

d) Associar os dados do tempo de duplicação com a cito-toxicidade encontrada.

4 Metodologia

Toda metodologia está representada no organograma a seguir:



Primeiramente, as linhagens de células tumorais foram categorizadas quanto à expressão relativa do gene da telomerase. A toxicidade do inibidor de telomerase MST-312 foi avaliada em culturas de células tumorais humanas de diferentes origens. Os dados coletados foram analisados estatisticamente e interpretados em conjunto.

4.1 Cultura de células

As linhagens celulares usadas, U251(glioblastoma), MDA-MB-231(câncer de mama), HEK – 293 (célula de rim embrionário imortalizado), CT- 26 (carcinoma), HCT (câncer colorretal), SCC3 (carcinoma) e Mewo (melanoma) foram cultivadas em placas plásticas de 10 cm de diâmetro, específicas para esse fim, a 37ºC em meios de cultura adequados suplementados com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), em atmosfera úmida com 5% de CO2.

4.2 Caracterização da expressão de telomerase

Após uma contaminação do laboratório, algumas linhagens se perderam. Com as linhagens que sobraram foi realizada a extração do RNA para verificar pureza e integridade e assim fazer a produção do cDNA, que é o DNA complementar ao RNA de interesse e a partir do cDNA realizar a PCR.

A expressão de telomerase foi averiguada nas células em cultura por meio da técnica de RT-PCR semi-quantitativa, que é uma reação da transcriptase reversa seguida de PCR, o qual a partir do RNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza o cDNA. A técnica foi efetuada como parte da execução do projeto geral e os dados foram dispostos para que apenas linhagens com elevada expressão da enzima integrassem o estudo.

A reação foi realizada com 30 ciclos de 94ºC por 30 segundos; 56ºC por 45 segundos e 72ºC por 45 segundos. Em 10 µM de volume final da reação tínhamos: dNTP´s com 50 mM cada, usada como matéria prima para a síntese das fitas filhas, 3 U de Taq DNA Polimerase, que é a enzima que promove a adição das dNTP's para a síntese da fita complementar a partir da fita molde, 0,5 mM de primers, sendo estes pequenas sequências de DNA que delimita a sequência alvo e 1,5mM de cloreto de magnésio, usado como cofator e 2µL de amostra. Foi utilizado gel de agarose 2% para a realização da eletroforese a 200 M.A, 200 V, por 60 minutos e assim a visualização das bandas, hTERT com 252pb e GAPDH com 450pb.

4.3 Avaliação de atividade citotóxica do inibidor em células tumorais que expressam telomerase

A toxicidade do inibidor de telomerase MST-312 nas células de cada linhagem tumoral foi avaliada a partir do tratamento das culturas com concentrações crescentes da droga e posterior medida de viabilidade por meio do clássico teste do MTT. Pegou-se uma placa de 96 poços e foi colocado a linhagem e todos os poços e deixou por um dia de cultivo, logo após foi colocado o MST-312 deixando por 80 horas, depois foi colocado o MTT, deixado por aproximadamente 1 hora e feito a leitura no espectrofotômetro. Os dados foram submetidos às análises estatísticas do programa GraphPad, Prism 5, incluindo cálculo de mínima concentração tóxica (MCT) e IC50 por regressão não linear.

4.4 Tempo de duplicação

O tempo de duplicação foi calculado através da análise de viabilidade celular em culturas de baixa confluência a cada certo período de tempo por 5 dias, resultando em 9 leituras. Para isso, as células foram plaqueadas em placa de 96 poços, a qual em cada poço foi acrescido as linhagens celulares juntamente com o meio de cultura, a uma densidade que impeça o contato célula-célula, a medida da viabilidade foi iniciada 24 horas após o plaqueamento e repetida em grupos de 8 poços a cada novo período de tempo através do teste de MTT. Os resultados foram expressos como absorbância relativa e uma curva foi construída para cálculo da taxa de crescimento na fase log (tempo de duplicação). Para o teste, o meio de cultura foi trocado e o MTT, dissolvido em tampão fosfato, adicionado em cada poço (1 mg/mL). Após duas horas de incubação, as células foram lisadas pela adição de 100 µL de duodecil sulfato de sódio a 20% (p/v) em dimetilformamida a 50% (v/v). Para quantificação da viabilidade, a placa foi submetida à espectrofotometria e a absorbância medida em um comprimento de onda de 630 nm, usando um leitor de microplacas. Um poço contendo meio de cultura e MTT, sem células, funcionou como branco, e o valor de absorbância deste foi descontado de todos os outros.

4.5 Análise estatística

Todos os dados receberam tratamento do soft GrandPad, sendo expressos como média e erro médio padrão, ou mediana e percentil, de acordo com a distribuição, observando a simetria dos dados, estes foram analisados por testes paramétricos quando a distribuição foi normal, ou não paramétricos quando a distribuição não foi normal, admitindo o valores >1 ou <-1 como valores extremos aceitáveis como normais. Os testes escolhidos foram descritos na apresentação dos resultados e os valores de P (probabilidade daquele evento ter sido por acaso) adotados como estatisticamente significantes nas análises sendo aqueles inferiores a 0,05.

Logo após foi calculado o IC50 da droga, colocando primeiramente os dados em escala para ver quanto a viabilidade foi diminuindo à medida que se aumentou a concentração do MST-312. Depois foi colocado em log da concentração para melhor analisar a distribuição dos resultados. Assim, foi encontrada a função logarítmica capaz de descrever melhor os dados. Para achar a equação que mais se adequou foi usada regressão não linear. A escolha foi dada por meio da análise do R^2 (Razão dos quadrados das distâncias dos pontos para a linha), quanto mais próximo o valor foi de 1, melhor a equação representou os dados e assim, foi achado o valor do IC50.

Para o cálculo do tempo de duplicação foi construído um gráfico de viabilidade por tempo e também por regressão não linear. A equação gerada foi exponencial.

5 Resultados

5.1 Caracterização da expressão de telomerase

As linhagens celulares de U251, MDA-MB-231 e HEK-293 foram submetidas à RT-PCR para verificação da expressão de telomerase. Os três foram telomerase positiva, aparentemente há diferenças nos níveis de expressão (figura 3).

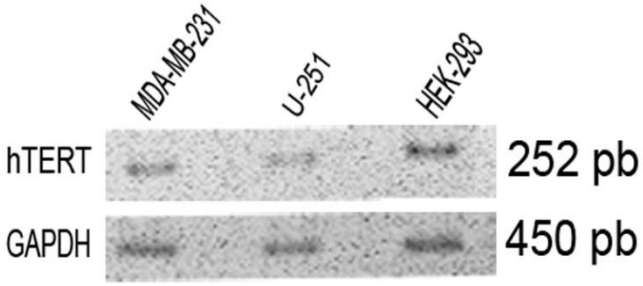


Fig. 4: Expressão de telomerase nas linhagens MDA-MB-231, U251 e HEK-293: A presença das bandas indica presença de telomerase.

5.2 Avaliação de atividade citotóxica do inibidor em células tumorais que expressam telomerase

O ensaio MTT foi utilizado para analisar o efeito da droga sobre a proliferação de células, sendo depois analisadas estatisticamente. A partir da análise dos valores significativos de viabilidade (P<0,05) de cada concentração, temos:

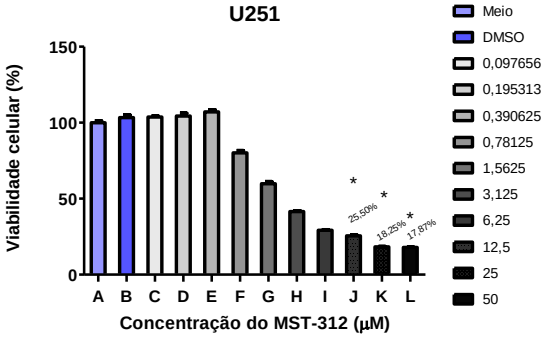
Linhagem	Concentrações
MDA-MB-231	25µM - 50µM
HEK-293	12,5µM - 25µM - 50µM
U251	12,5µM - 25µM - 50µM

Quadro 1: Concentrações de MST-312 que obtiverem valor de P menor que 0,05 para cada linhagem, com diferença significativa entre a viabilidade nas concentrações e controle.

O DMSO não teve efeito sobre a viabilidade celular quando comparado ao grupo controle em qualquer das linhagens, a aparente diferença nos três casos não foi estatisticamente significativa.

Os resultados de MTT do tratamento das células com MST-312 estão apresentados a seguir (fig. 5):

(a)



(b)

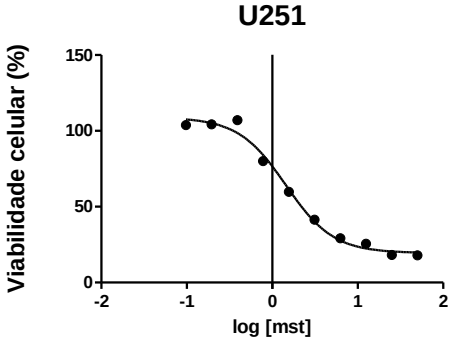
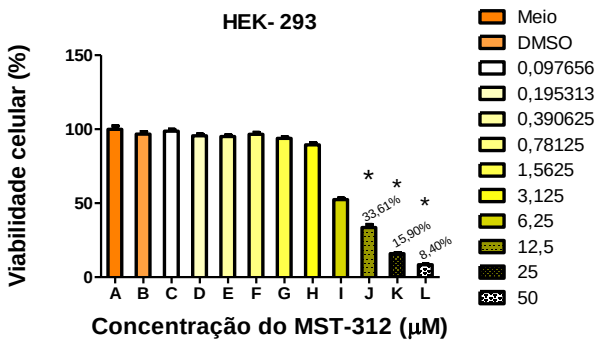


Fig. 5: (a) Atividade dose-dependente do MST-312 sobre as células de U251 tratadas por 80 horas. Os dados estão em percentual em relação ao controle, e as barras mostram as medianas dos grupos. Utilizando o Teste t para comparar as duas primeiras colunas, que são os controles, temos valor de P igual a 0,0931, não sendo um valor significativo (P<0,05). Para comparação entre a coluna B, controle, com as demais colunas, foi usado o teste Kruskal-Wallis, teste não paramétrico, pois os dados não possuem distribuição normal nas colunas A, B, I, J e L, com pós-teste de Dunn's. * Concentrações que apresentaram valores significativos com P < 0,05. (b) Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células U251. Gráfico em função logarítmica, concentração em log em relação à viabilidade celular. A viabilidade diminui a cada unidade de concentração que se aumenta. O valor de R^2 foi igual a 0,9836, sendo bem representativa dos dados ($1>R^2>0,95$) e com IC50 igual a 2,03 micromolar.

Nos gráficos fica evidente a redução da viabilidade, sendo esta então dose-dependente.

(a)



(b)

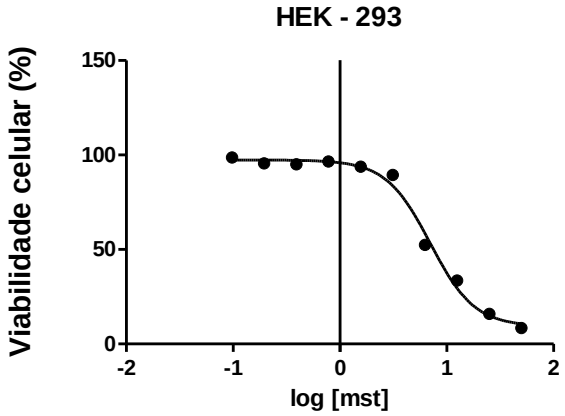
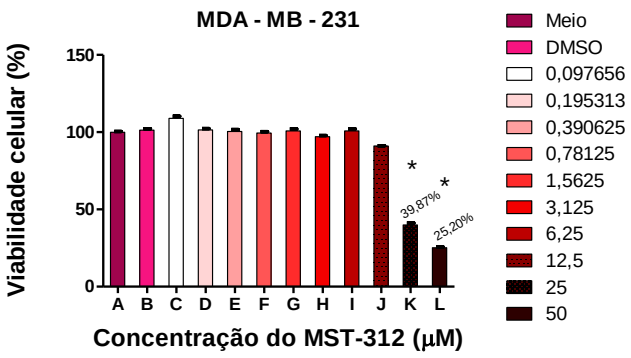


Fig. 6: (a) Atividade dose-dependente do MST-312 sobre as células HEK-293 tratadas por 80 horas. Os dados estão em percentual em relação ao controle, e as barras mostram as medianas dos grupos. Utilizando o Teste T para comparar as duas primeiras colunas, que são os controles, temos valor de P igual a 0,1206, não sendo um valor significativo (P<0,05). Para comparação entre a coluna B, controle, com as demais colunas, foi usado o teste Kruskal-Wallis, teste não paramétrico, pois os dados não possuem distribuição normal nas colunas A, B, I, J e L, com pós-teste de Dunn's. * Concentrações que apresentaram valores significativos com P<0,05. (b) Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células HEK-293. Gráfico em função logarítmica, concentração em log em relação à viabilidade celular. A viabilidade diminui a cada unidade de concentração que se aumenta. O valor de R^2 foi igual a 0,9836, sendo bem representativa dos dados ($1>R^2>0,95$) e com IC50 igual a 7,87 micromolar.

O efeito produzido do MST-312 nas linhagens estudadas tiveram variações entre si quanto ao seu potencial em reduzir a viabilidade. Sabe-se então que para a linhagem HEK, 7,87 µM é a concentração que mata 50% das células, para MDA é 16,21 µM e U251 é 2,03 µM. Vemos que o U251 foi mais susceptível ao efeito do MST-312 por possuir um IC50 menor em relação aos outros.

(a)



(b)

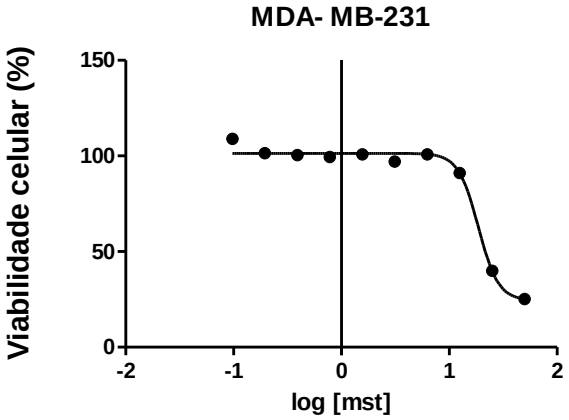


Fig. 7: (a) Atividade dose-dependente do MST-312 sobre as células de MDA-MB-231 tratadas por 80 horas. Os dados estão em percentual em relação ao controle, e as barras mostram as medianas dos grupos. Utilizando o Teste T para comparar as duas primeiras colunas, que são os controles, temos valor de P igual a 0,3357, não sendo um valor significativo (P<0,05). Para comparação entre a coluna B, controle, com as demais colunas, foi usado o teste Kruskal-Wallis, teste não paramétrico, pois os dados não possuem distribuição normal nas colunas C e K, com pós-teste de Dunn's. * Concentrações que apresentaram valores significativos com P < 0,05. (b) Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células de MDA-MB-231. Gráfico em função logarítmica, concentração em log em relação à viabilidade celular. A viabilidade diminui a cada unidade de concentração que se aumenta. O valor de R^2 foi igual a 0,9792, sendo bem representativa dos dados ($1>R^2>0,95$) e com IC50 igual a 16,21 micromolar.

Os valores do MCT (menor concentração tóxica) e IC50 de cada linhagem estão expressos a seguir:

Linhagem	MCT	IC50
MDA-MB-231	25µM	16,21
HEK-293	12,5µM	7,87
U251	12,5µM	2,03

Quadro 2: Menor concentração tóxica (MCT) dentre as testadas que apresentou diferença significativa para o controle e IC50 de cada linhagem.

5.3 Tempo de Duplicação

Abaixo estão representados os gráficos do tempo de duplicação das linhagens, ou seja, o tempo que cada cultura leva para dobrar de tamanho.

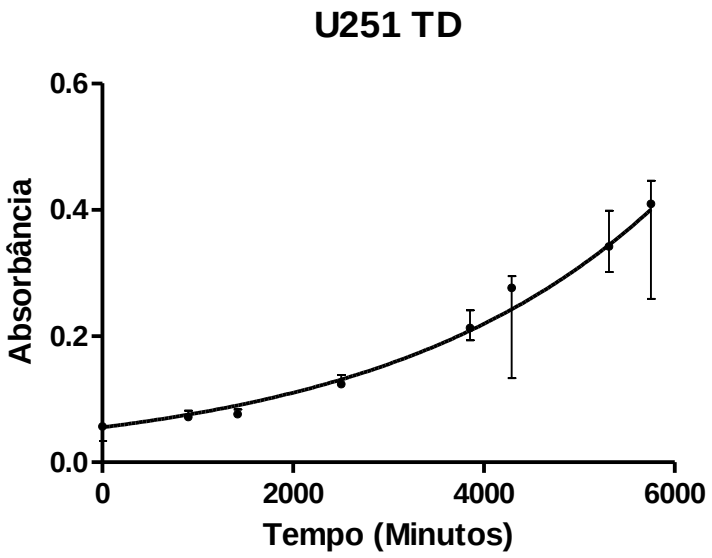


Fig 8: Regressão não linear do tempo de duplicação da linhagem U251. Gráfico de viabilidade por tempo (min). O valor de R^2 foi igual a 0, 9405 ($1>R^2>0,95$).

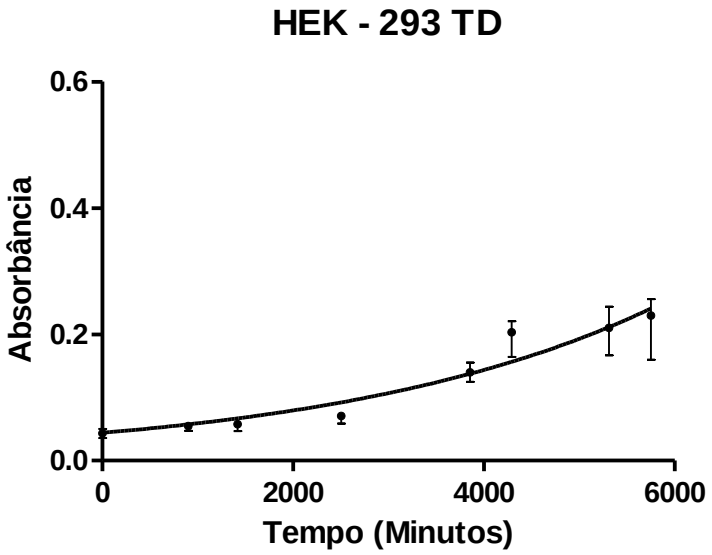


Fig. 9: Regressão não linear do tempo de duplicação da linhagem HEK-293. Gráfico de viabilidade por tempo (min). O valor de R^2 foi igual a 0, 8851 ($1>R^2>0,95$).

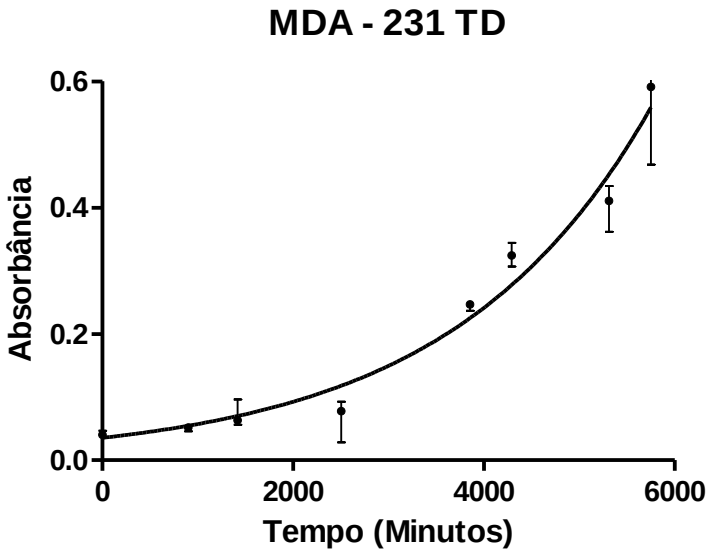


Fig.9: Regressão não linear do tempo de duplicação da linhagem MDA-MB-231. Gráfico de viabilidade por tempo (min). O valor de R^2 foi igual a 0, 9578 ().

Os resultados do tempo de duplicação estão expressos a seguir:

Linhagem	R^2	Tempo de Duplicação (min)	Tempo de duplicação (horas)
MDA-MB-231	0,9578	1446	24 horas e 6 min
HEK-293	0,8851	2346	39 horas e 6 min
U251	0,9405	2016	33 horas e 36 min

Quadro 3: Tomando R^2 entre $1>R^2>0,95$, a partir da regressão exponencial. Tempo de duplicação expressos em minutos e em horas.

6 Discussões

Ao analisarmos as figuras 5(a), 6(a) e 7(a), vemos que de acordo com as variações das concentrações de MST-312, temos a toxicidade sendo aumentada ou diminuída. Observamos que houve toxicidade para a célula tumoral nas concentrações de 12,5; 25 e 50µM para HEK e U251, e nas de 25 e 50 µM para MDA. Sendo a menor concentração tóxica de HEK e U251 12,5µM e para MDA 25µM, mostrando maior suscetibilidade para HEK e U251 em relação ao MDA.

Segundo o trabalho de Ren e colaboradores, 2010, o tratamento da linhagem celular U251 com inibidor MicroRNA – 21 em combinação com taxol obteve um IC50

igual a 60 µM, em um período de tempo de 72 horas. O MST-312 teve maior potencial tóxico para a célula tumoral, uma vez que precisou de apenas 2,03 µM do inibidor para inibir a viabilidade celular em 50% das células, em 80 horas. Apesar da diferença de tempo de 80 pra 72 horas, não foi uma diferença grande suficiente que justifique a diferença de 2,03µM para 60µM. Além disso, a vantagem do MST-312 está no fato de se tratar de uma molécula pequena enquanto o MicroRNA-21 é um oligonucleotídio, uma molécula grande, possuindo complicada aplicação clínica e assim difícil absorção e estudo farmacotécnico adequado.

Outra comparação que pode ser feita é com o composto isotiocianato fenetil derivado de glucosinolato. Resultados mostram que o tratamento de células MDA-MB-231 com concentrações variáveis desse composto durante 24 horas, reduziu a sobrevivência das células com um IC50 de 8 µM. Assim vemos que o composto agiu de modo mais eficaz que o MST-312 nas células de MDA, uma vez que em um período de tempo menor, de apenas 24 horas, ele necessitou de uma concentração de 8 µM para inibir a viabilidade celular em 50% das células, enquanto o MST-312 necessitou de 18, 61 µM, em 80 horas, para o mesmo fim. Então tanto a diferença de concentração, quanto a diferença de tempo justificam a maior potencialidade do composto em relação ao MST-312 nas células de MDA (GUPTA & SRIVASTAVA, 2012).

Com HEK–293 há um estudo sobre o etoposídeo mostrando um IC50 de 0,6µM nas células após 72 horas de exposição. Com o MST-312, o HEK teve um IC50 de 7,87 µM, sendo maior que a encontrada para o etoposídeo, porém em 80 horas. Assim temos o etoposídeo possuindo maior potencial tóxico que o MST-312 para a célula HEK-293 (PONDER et al., 2011).

Vemos assim a possibilidade do MST-312 como terapia adjuvante, uma vez que possa possuir mecanismo de ação diferenciado de outros quimioterápicos, dado que a associação de drogas pode levar a redução da concentração delas e assim reduzir o efeito adverso.

Pode ser observado ainda que mesmo o MST-312 sendo menos potente que outras drogas nas linhagens estudadas, é importante ter um arsenal de quimioterápicos porque necessariamente alguns tumores irão adquirir resistência

uma vez que este fenômeno é muito comum no tratamento quimioterápico do câncer (PONDER et al., 2011).

Analisando o tempo de duplicação, vemos que para HEK a cada 39 horas e 6 minutos a cultura dobra de tamanho, para MDA-MB-231 a cada 24 horas e 6 minutos e para o U251 a cada 33 horas e 36 minutos. A droga foi tóxica em um intervalo de tempo de 80 horas, sabemos então que ocorreram 2,04 duplicações (2 ciclos) para HEK, 3,31 duplicações (3 ciclos) para MDA e 2,38 duplicações(2 ciclos) para U251 neste intervalo. Sabendo que dependendo da célula ela leva de 30 a 60 ciclos para encurtar o telômero, e que se observa que não ocorre crise telomérica com ciclos abaixo de 10, vemos que não houve tempo suficiente para o encurtamento, concluindo que o efeito tóxico do MST-312 não foi por inibição da telomerase, pois não houve tempo para a célula entrar em crise.

Assim, podemos analisar ações do MST-312, como o mostrado no trabalho de Wang e colaboradores (WANG et al., 2015) o qual a administração de curta duração do MST-312 levou a um efeito agudo, com danos no DNA e redução da viabilidade celular. Também neste projeto, as células foram tratadas em um curto período de tempo pelo MST-312 levando a uma ação citotóxica para MDA-MB- 231, HEK-293 e U251.

Como visto, os quimioterápicos são drogas utilizadas para o tratamento das neoplasias. Seus mecanismos de ação são classificados em ciclo-inespecíficos, que são aqueles que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo, como, por exemplo, a mostarda nitrogenada. Podem ser ciclo-específicos, sendo aqueles que atuam somente nas células que se encontram em proliferação, como o caso da ciclofosfamida e ainda fase-específicos, aqueles que atuam em determinadas fases do ciclo celular, como o metotrexato (fase S), o etoposídeo (fase G2) e a vincristina (fase M) (INCA, 2015b).

Analisando estes dados, pode-se sugerir outro mecanismo de ação do MST-312, em que ele atuaria em alguma fase do ciclo celular conforme ocorre com os quimioterápicos, uma vez que a cada unidade acrescida na concentração do MST-312 levou a uma diminuição da viabilidade da célula.

Um estudo teve como objetivo investigar os efeitos do MST-312 em células de leucemia promielocítica aguda (LPA). Os resultados mostraram que o MST-312 exerceu um efeito citotóxico de curto prazo dependente da dose sobre as células LPA, com parada G2 / M do ciclo celular. Além disso, MST-312 induziu a apoptose de células mediado por caspases. O ensaio revelou a uma redução significativa na atividade de telomerase de células LPA após a exposição em curto prazo de MST-312. A inibição da telomerase, induzida por MST-312, foi acoplado com a supressão da atividade de NF-kB pela inibição da fosforilação IκBα, sua degradação e diminuição da atividade de ligação do DNA. É importante dizer que o MST-312 não apresentou qualquer efeito apoptótico em células normais humanas mononucleares de sangue periférico (Fatemi et al., 2015).

Em outro estudo foi avaliado os efeitos do MST-312 sobre a dinâmica dos telômeros, expressão gênica e danos no DNA em células de câncer de mama. Os resultados mostraram que o MST-312 diminuiu a atividade da telomerase, e induziu a disfunção telomérica e a parada do crescimento das células de câncer de mama. Nas células MDA-MB-231 tratadas com MST-312, a proteína TRF2 telômero-protetora foi regulada negativamente. MST-312 induziu danos ao DNA em telômeros, acompanhados da redução da expressão de genes relacionados com a reparação do DNA (Gurung et al., 2015).

Teorias clássicas mostram a hipótese de que a parada do ciclo celular é um mecanismo de autoproteção, para permitir tempo suficiente para reparar o dano ao DNA. Se as células são eficientemente reparadas, eles vão reentrar no ciclo celular. Uma vez que o dano ao DNA é demasiado grave para ser reparado, as células acabarão por morrer, o que poderia então ter acontecido sob a ação do MST-312.

Estes artigos mostram o potencial do MST-312 como inibidor da enzima telomerase. Porém, não existem muitos dados na literatura a cerca do mecanismo de ação do MST-312 na redução de viabilidade celular, independente da telomerase, conforme os dados encontrados neste trabalho. Porém, como já observado em outros trabalhos citados, foi visto redução da viabilidade mesmo em tratamentos em curto prazo.

Vemos assim, o efeito que o MST-312 tem sobre as linhagens celulares, podendo atuar de diferentes maneiras, mostrando que seu mecanismo de ação precisa ainda ser elucidado.

Além disso, o MST-312 pode ser usado como ferramenta experimental para indução de aquisição do fenótipo AAT (alongamento alternativo de telômero). O AAT é provavelmente mediado por mecanismos de numerosas proteínas envolvidas na função do telômero, recombinação homóloga, reparação de danos e replicação do DNA. Portanto, todas as células cancerosas exibem tempo de vida indefinido, seja por mecanismos que envolvem a telomerase ou por meio do alongamento alternativo de telômero. Sabe-se que ele mantém a estrutura telomérica por mecanismos independentes da telomerase (HWANG et al., 2014). Poder-se-ia criar linhagens tumorais AAT+, a partir de linhagens telomerase +, inibindo a telomerase, iria induzir a célula a forçar o alongamento alternativo de telômero para sobreviver.

A telomerase é basicamente indetectável nas células somáticas, sendo assim, expressa na grande maioria dos cânceres, de 85% a 90%, no restante, 10% a 15% dos tumores humanos a manutenção dos telômeros é regida pelo AAT. Como resultado, são resistentes a compostos inibidores de telomerase (UZIEL et al., 2014).

Devido a esta característica comum de todos os cânceres, telômeros e proteínas associadas à telômeros estão se tornando alvos atraentes para terapias oncológicas (HWANG et al., 2014).

7 Conclusões

No nosso estudo observamos que houve presença de telomerase nas três linhagens estudadas e que o MST-312 atuou de forma dose-dependente, sendo que seu mecanismo de ação sobre as linhagens MDA-MB-231, HEK-293 e U251 não foi por inibição da telomerase, uma vez que não houve ciclos suficientes que caracterizassem o encurtamento dos telômeros. Como resultado, o U251 apresentou maior suscetibilidade com o MST-312, com IC50 igual a 2,03 µM, enquanto HEK obteve IC50 igual 7,87 µM e MDA IC50 igual 16,21 µM.

Diversos estudos mostraram a atuação do MST-312 com foco no processo de inibição da telomerase. Assim, este estudo lançou novas rotas de pesquisa, vendo a ação do MST-312 de modo independente da telomerase. Vemos assim, que diversas sugestões podem ser dadas na tentativa de elucidar a sua atuação.

É importante ainda notar a ferramenta que o MST-312 pode se tornar diante das realidades do câncer, uma vez que pode ser usado como terapia adjuvante, e ainda como instrumento na investigação de novos compostos e terapias oncológicas. Concomitante a isso, poderá ser usado dentro de pesquisas que possuem o alongamento alternativo de telômero como alvo.

8 Referências Bibliográficas

BASU N, S. H. L. K. V. R. B. E. B. L. **Telomeres and telomere dynamics: relevance to cancers of the gastrointestinal tract**. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, v. 7, p. 733–748, Novembro 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acesso ao tratamento oncológico**. 2014. Disponível em:<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/01/ministerio-da-saude-expande-acesso-ao-tratamento-oncologico> Acessado em: 19/05/2015 às 10:19h.

CAVALLI, F. **Cancer prevention in the developing world: mission impossible?** Recent Results in Cancer Research, v. 181, p. 33-39, 2009.

CREES Z., J. G. . Z. R. . G. M. B. K. H. C. S. L. W. A. L. S. S. B. U. J. T. D. A. **N. P. Oligonucleotides and G-quadruplex Stabilizers: Targeting Telomeres and Telomerase in Cancer Therapy**. Current Pharmaceutical Design, v. 20, p. 6422-6437, 2014.

DAVID A. R. & ZIMMERMAN, M. R. **Cancer: an old disease, a new disease or something in between?** Nature Reviews Cancer, v. 10, p. 728-733, 2010.

DRASKOVIC I. & Londono-Vallejo A. **Telomere Recombination and the ALT Pathway: A Therapeutic Perspective for Cancer**. Current Pharmaceutical Design, v.20, p. 6466-6471, 2014.

DUVAL P. A., VARGAS B. L., FRIPP J. C., ARRIEIRA I. C. O., LAZZERI B., DESTRI K., ASSUNÇÃO M. C. F. **Caquexia em Pacientes Oncológicos Internados em um Programa de Internação Domiciliar Interdisciplinar**. Revista Brasileira de Cancerologia, v.56, p.207-212, 2010.

ELYSIA P. M. T. COHN, K.-L. W., T. R. R. P., N. O. R. **A New Strategy for Detection and Development of Tractable Telomerase Inhibitors**. Journal of Medicinal Chemistry, v.55, p.3678-3686, 2012.

FATEMI A., SAFA M., KAZEMI A. **MST-312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cells through inhibition of telomerase activity and suppression of NF-κB pathway**. Tumor Biology, 2015.

FEIJOO P., D. D., T. L., G. A. **Telomere-Dependent Genomic Integrity: Evolution of the Fusion-Bridge-Breakage Cycle Concept**. Current Pharmaceutical Design, v.20, p.6375-6385, 2014.

GIACOMINI, G. **Técnicas e perspectivas de tratamentos imunoterápicos em câncer**. 2009. TCC, Bacharel, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita", Rio Claro, 2009.

GUPTA & SRIVASTAVA. **Antitumor activity of phenethyl isothiocyanate in HER2-positive breast cancer models.** BMC Medicine, v.10, p.80, 2012.

GURUNG R. L., LIM S. N., LOW G. K., HANDE M. P. **MST-312 Alters Telomere Dynamics, Gene Expression Profiles and Growth in Human Breast Cancer Cells.** J Nutrigenet Nutrigenomics, v. 7, p.283-298, 2015.

HANAHAN D. & WEINBERG R. **A. Hallmarks of Cancer: the next generation**. Cell 144:646-674, 2011.

HU, E. A. **Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer**. Cell, v. 148, p. 651–663, 2013.

HWANG H., A. K., J. C., J. L., Y. K., J. M., D. P., S. P., L. O., S. M. **Telomeric Overhang Length Determines Structural Dynamics and Accessibility to Telomerase and ALT-Associated Proteins**. Structure, v.22, p.842-853, 2014.

IMMANUAL J., R. T., E. B., E. A. **The Telomerase Inhibitor Imetelstat Depletes Cancer Stem Cells in Breast and Pancreatic Cancer Cell Lines**. Cancer Res, v.70, p.9494-9504, 2010.

INCA, Instituto nacional do câncer. **ABC do Câncer**: **Abordagens básicas para o controle do câncer**. 2. Ed. Rio de Janeiro, 2012.

INCA, Instituto nacional do câncer. **O que é o câncer?** Rio de Janeiro: INCA; 2013.

INCA, Instituto nacional do câncer. **Quadro clínico do câncer**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

INCA, Instituto nacional do câncer. **Quimioterapia**. Rio de Janeiro: INCA; 2015b. Disponível em:< http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101. Acessado em 5/06/2015 às 12:04h.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro – Brasil, 2015a. http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2. Acessado em 20/05/2015 às 14:45h.

LEWIN J. & SIU L.L. **Cancer genomics: the challenge of drug accessibility**. Curr Opin Oncol., v. 27, p. 250-257, 2015.

MENDER I., GRYAZNOV S., DIKMEN Z. G., WRIGHT W.E., SHAY J. W. **Induction of Telomere Dysfunction Mediated by the Telomerase Substrate Precursor 6-Thio-2 ′-Deoxyguanosine**. Cancer Discovery, v. 5, p.82-95, 2015.

PONDER J., YOO B. H., ABRAHAM A. D., LI Q., ASHLEY A.K., AMERIN C.L., ZHOU Q., REID B.G., REIGAN P., HROMAS R., NICKOLOFF J.A., LABARBERA D.V. **Neoamphimedine Circumvents Metnase-Enhanced DNA Topoisomerase IIα Activity Through ATP-Competitive Inhibition.** Mar. Drugs, v.9, p.2397-2408, 2011.

REDDEL, R. R. **Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer: Clinical Implications.** Current Pharmaceutical Design, v.20, p. 6361-6374, 2014.

REN Y., ZHOU X., MEI M, YUAN X. B., HAN L., WANG G. X., JIA Z. F, XU P., PU P. Y., KANG C. S . **MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol**. BMC Cancer**,** v.10, p. 27, 2010.

ROBBINS**,** S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Fundamentos de Robbins patologia estrutural e funcional**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010a.

ROBBINS, S. L et al. In:_____. **Patologia – Bases patológicas das doenças**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010b.

ROBBINS S. L. et al. In:____. **Fundamentos de Patologia.** 8ª ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 2012.

ROMANIUK A., P. K., K. K., B. R. **Telomerase Modulation in Therapeutic Approach**. Current Pharmaceutical Design, v.20, p.6428-6451, 2014.

SANTAMBROGIO F., G. P., C. R., Z. N., F. M. **MicroRNA-dependent Regulation of Telomere Maintenance Mechanisms: A Field as Much Unexplored as Potentially Promising**. Current Pharmaceutical Design, v.20, p.6404-6421, 2014.

SARETZK, G. **Extra-telomeric Functions of Human Telomerase: Cancer, Mitochondria and Oxidative Stress**. Current Pharmaceutical Design, v.20, p.6386-6403, 2014.

SEKARAN V., S. J., B. M. **Telomere Maintenance as a Target for Drug Discovery**. Journal of Medicinal Chemistry, v.57, p.521-538, 2014.

SEKHRI K. **Telomeres and telomerase: Understanding basic structure and potential new therapeutic strategies targeting it in the treatment of cancer**. J Postgrad Med., v.60, p.303-308, 2014.

STIVAROU T. & PATSAVOUDI E. **Extracellular Molecules Involved in Cancer Cell Invasion**. Cancers, v. *7*, p. 238-265, 2015.

TOLEDO, S. R. C. D. Genética do Câncer. In: SCHOR, N.; BOIM, M. A.; SANTOS, O. F. P. **Bases Moleculares da Biologia, da Genética e da Farmacologia**. 1ª. ed. [S.l.]: Atheneu, v. 1, 2005. Cap. 19, p. 245-253.

UZIEL O., O. C. E. B. J. N. A. M. L. **The effect of Bortezomib and Rapamycin on Telomerase Activity in Mantle Cell Lymphoma.** Translational Oncology, v.7, p. 741-751, 2014.

UZIEL O. & LAHAV M. **Conventional Anticancer Therapeutics and Telomere Maintenance Mechanisms**. Current Pharmaceutical Design, v.20, p.6452-6465, 2014.

WANG, Y. E. A., SUN C., MAO A., ZHANG X., ZHOU X., WANG Z., ZHANG H. **Radiosensitization to X-ray radiation by telomerase inhibitor MST-312 in human hepatoma HepG2 cells**. Life Sci, v. 123, p. 43-50, 2015.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Health topics: Cancer**. 2013 Disponível em: http://www.who.int/topics/cancer/en/> Acessado em 15/05/2015 às 14:32h.

WHO. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Cancer: Fact sheet N°297. Fev 2014.

YATABE N., K. S., K. S., K. T., W. Z., M. Y., T. M., N. M., T. M., I. M. **2-5A antisense therapy directed against human telomerase RNA inhibits telomerase activity and induces apoptosis without telomere impairment in cervical cancer cells**. Cancer Gene Therapy, v.9, p. 624-630, 2002. (YATABE, 2002)

XIU L. J., SUN D. Z., JIAO J. P., YAN B., QIN Z. F., LIU X., WEI P. K., YUE X. Q. **Anticancer effects of traditional Chinese herbs with phlegm-eliminating properties - an overview**. Journal of Ethnopharmacology, v.15, p.364-365, 2015.