

## **AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO TRATAMENTO COM INIBIDOR DE TELOMERASE *IN VITRO* NO CARIÓTIPO E MORFOLOGIA CELULAR**

Guilherme Guimarães da Silva <sup>1</sup>; Karollyne da Silva Morais <sup>2</sup>; Diêgo Madureira de Oliveira <sup>3</sup>.

1. Estudante de IC da Faculdade de Ceilândia da UnB

2. Doutoranda da Faculdade de Ceilândia da UnB

3. FCE-UnB – Colegiado de Bases Biológicas / Orientador

### **Resumo:**

Entender o processo de imortalização celular seria importante para o desenvolvimento de terapias antineoplásicas mais efetivas. Já se sabe que a maioria das células cancerosas consegue se imortalizar pela expressão da enzima telomerase e uma minoria pelo processo de alongamento alternativo de telômeros (AAT). Dessa forma, a implementação de uma nova metodologia baseada na indução do fenótipo AAT por meio de pressão seletiva com os inibidores de telomerase seria válida.

Nesse trabalho, analisou-se a ação de tratamento a longo prazo do inibidor de telomerase MST-312 nas mudanças no cariótipo e na morfologia de células de câncer de mama humano.

Ao fim, verificou-se que a droga é efetiva em aumentar a frequência de aberrações cromossômicas e cariótipos exibindo figuras sugestivas de crise telomérica, sugerindo que esse seria um possível agente para pressão seletiva no estudo de AAT.

Os achados revelados são importantes, pois a terapia antitelomerase tem sido muito discutida na atualidade.

**Autorização legal:** Não foi necessária autorização legal para realização dessa pesquisa.

**Palavras-chave:** cariótipo; telomerase; MST-312.

**Apoio financeiro:** Fundação de apoio a Pesquisa do Distrito Federal- FAPDF.

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UnB.

### **Introdução:**

A cada replicação uma célula sadia perde de 50 a 200 nucleotídeos [1], sendo que tais nucleotídeos são retirados dos telômeros (estruturas encontradas na parte final dos cromossomos que têm composição proteica e de DNA não-codificante, que servem para manter a estabilidade estrutural dos cromossomos).

Um processo essencial para a tumorigênese é a imortalização celular, pois tal processo possibilita que as células tumorais adquiram a capacidade de promover a manutenção dos telômeros a cada divisão celular, o que possibilita que uma célula possa se dividir ilimitadamente (em condições normais, os telômeros diminuem a cada ciclo de divisão até um tamanho crítico, momento em que a célula entra na crise telomérica, caracterizada por múltiplas aberrações cromossômicas).

É conhecido que em aproximadamente 85% dos casos de câncer, o processo de imortalização celular acontece pela expressão da telomerase (enzima responsável pela síntese de telômeros, naturalmente suprimida durante o desenvolvimento normal) [2], o que faz das drogas inibidoras dessa enzima agentes perfeitos para terapia farmacológica do câncer, não fosse o fato de que o pequeno percentual restante consegue manter a estrutura telomérica por meio de mecanismos independentes de telomerase conhecidos como alongamento alternativo de telômero (AAT)[3,4], havendo, portanto, uma possível rota de escape para as células submetidas a tal terapia farmacológica.

O MST-312 (Figura 1) é um composto sintético provindo da catequina epigallocatequina galato (substância encontrada no chá verde) e tem se mostrado como uma droga que tem boa atividade inibitória sobre a enzima telomerase [5].

Na tentativa de subsidiar o desenvolvimento de novas metodologias de estudo do fenômeno AAT, baseada na indução de aquisição desse fenótipo, células tumorais foram submetidas à pressão seletiva com uso de inibidor de telomerase (MST-312).

Este trabalho visou identificar

modificações no cariótipo de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (são linhagens telomerase positiva [6,7]) visualizadas durante esse processo e o tempo que cada uma das linhagens leva para demonstrá-las após início do tratamento com o inibidor.

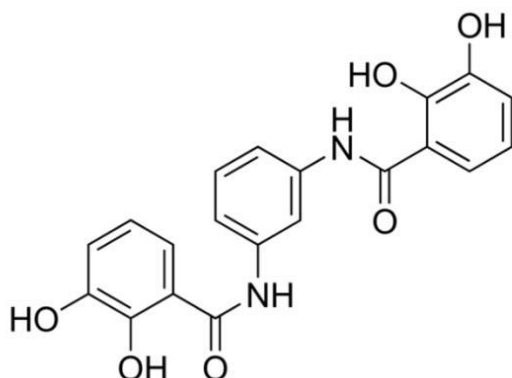


Figura 1. Estrutura química do MST-312.

## Metodologia:

### Cultura de células e tratamento

As linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram divididas em dois grupos (teste e controle) e tratadas com concentração subtóxica do inibidor MST-312 (2  $\mu$ M) ou do seu diluente (DMSO) por 18 semanas.

As linhagens celulares utilizadas no estudo foram cultivadas em placas plásticas de 3,5 cm de diâmetro, a 37°C em meios de cultura adequados suplementados 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100  $\mu$ g/mL), em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

O tratamento foi feito com MST-312, e as culturas foram tripsinizadas sempre que atingiam alta confluência de placa, onde, a cada tripsinização uma amostra das culturas era separada para realização da cariotipagem.

### Análise de cariótipo

Os grupos de células teste e controle foram lançados em placas de cultura e tratados com colchicina 0,05% por 1 hora.

Após isso, as células foram submetidas ao processo de tripsinização seguido do processo de centrifugação à 1500 rpm por 3 minutos, e o sobrenadante foi desprezado. Feito isso, essas foram ressuspensas em 3 mL de tampão hipotônico de KCl (0,075 M) e incubadas a 37 °C por 10 minutos em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, seguida de uma segunda centrifugação à 1000 rpm por 6 minutos.

Passada a etapa anterior, o sobrenadante era descartado, e o precipitado ressuspensado em 500  $\mu$ L de fixador com metanol/ácido acético 3/1, seguidas de uma

terceira centrifugação à 2000 rpm por 6 minutos, sendo que, após esse passo o sobrenadante era descartado e as amostras eram ressuspensas novamente em 500  $\mu$ L de fixador com metanol/ácido acético 3/1.

Após a fixação, era transferida uma gota de cada amostra para uma lâmina de vidro, e corava-se com Giemsa 5%.

As lâminas coradas foram analisadas com microscópio óptico sob objetiva de imersão. Os campos que apresentassem espalhamento de cromossomos metafásicos eram fotografados para identificação e contagem das alterações estruturais e/ou numéricas.

### Caracterização morfológica das sub-linhagens geradas

A morfologia das células em cultura foi monitorada por microscopia de contraste de fase e aquisição de micrografias através de máquina fotográfica digital acoplada ao microscópio e conectada a um computador munido do software de edição específico.

### Análise Quantitativa

Os campos que apresentaram espalhamento de cromossomos metafásicos foram digitalizados em scanner de alta resolução e submetidos à análise visual. Em lâminas de baixa confluência, foram quantificadas todas as células metafásicas e o percentual destas que apresentava alterações sugestivas de crise telomérica, e em lâminas de alta confluência, pelo menos cinco áreas aleatoriamente escolhidas, de 2 mm quadrados cada, foram utilizadas para a mesma quantificação.

Além da quantificação das figuras de crise telomérica também foram quantificadas as aberrações cromossômicas, seguindo o mesmo raciocínio.

### Resultados e Discussão:

A análise de cariótipo demonstrou diversas alterações numéricas, como multiploidia, ausência ou múltiplas cópias de cromossomos, além de aberrações estruturais, tais como aparente duplicação e deleção (Figura 2).

Após 18 semanas de tratamento foi possível observar aberrações cromossômicas (Figura 3) e figuras sugestivas de crise (Figura 4), sendo que, foram observadas aberrações cromossômicas em 5,6% das células MDA-MB-231 tratadas, contra 5,5 % no grupo controle. Enquanto na linhagem MCF7, foi possível observar aberrações cromossômicas em 18,9 % das células tratadas, enquanto no grupo controle 13,9% das células apresentaram

aberrações cromossômicas (Figura 5).

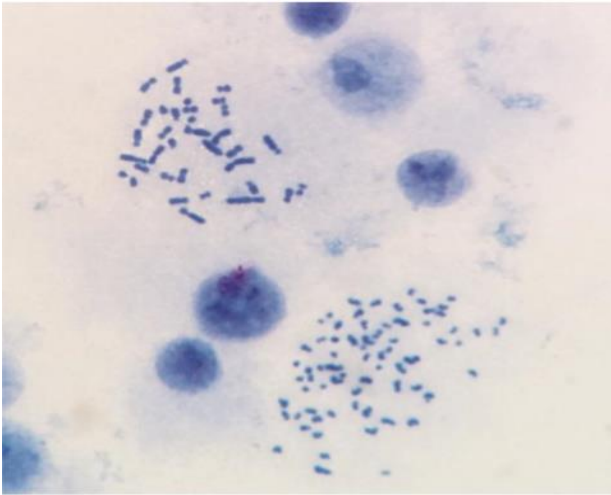


Figura 2. Exemplo de heterogeneidade de cariótipo numa mesma linhagem celular (MDA-MB-231)

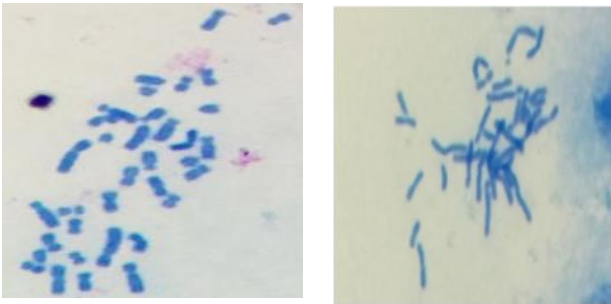


Figura 3. Comparação entre cariótipo típico da MDA-MB-231 (à esquerda) e outro cariótipo da MDA-MB-231 exibindo aberrações cromossômicas.



Figura 4. Exemplo de cariótipo com aberrações cromossômicas (à esquerda) e figura sugestiva de crise telomérica (à direita).

Quanto as figuras sugestivas de crise, foi possível verificá-las em 2,3% das células MDA-MB-231 tratadas, contra apenas 0,9 % no grupo controle. Já na linhagem MCF7, entre os cariótipos encontrados no grupo tratado, 2,7% eram de crise telomérica, enquanto no grupo controle estas não foram visualizadas (Figura 5). Não houve mudanças significativas na morfologia celular entre os grupos.

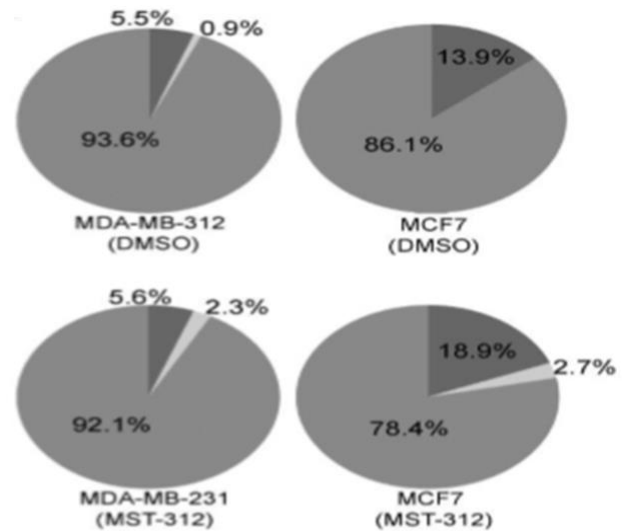


Figura 5. Gráficos demonstrando a distribuição das alterações nos cariótipos analisados (figuras de crise, cariótipo normal e cariótipo com aberrações, respectivamente, do cinza mais claro para o mais escuro).

### Conclusões:

Tais dados são indicativo de uma erosão telomérica efetiva e corroboram com a hipótese de que o tratamento de células com tais inibidores tem o potencial de selecionar clones que realizem o AAT.

### Referências bibliográficas

1. BAR C; BLASCO AM; Telomeres and telomerase as therapeutics targets to prevent and treat age-related diseases. 20 Jan 2016, 5(F1000 Faculty Rev):89.
2. Neumann AA, Reddel RR. Telomere maintenance and cancer: look, no telomerase. Nat Rev Cancer. 2002; 2(11): 879-84.
3. Chen W et al. Alternative lengthening of telomeres in hTERT-inhibited laryngeal cancer cells. Cancer Sci. 2010; 101(8): 1769-76.
4. Hu J et al. Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. Cell. 2012; 148(4): 651-63.
5. A., FATEMI; M., SAFA; A., KAZEMI. MST- 312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cell through inhibition of telomerase activity and suppression of NF-kB pathway. Tumor Biology. Published online on May/29/2015.

6. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1/j.13652184.2006.00383.x/abstract>, acesso em 09/08/16 7.
7. Sakin V, Eskiocak U, Kars MD, Iseri OD, Gunduz U. hTERT gene expression levels and telomerase activity in drug resistant MCF-7 cells. *Exp Oncol*. 2008 Sep;30(3):202-5.