



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CEILÂNDIA

CURSO DE FARMÁCIA

Tales Henrique Andrade da Mota

Atividade citotóxica do MST-312 em células tumorais independente da sua ação
inibidora da telomerase.

CEILÂNDIA DF

2017

TALES HENRIQUE ANDRADE DA MOTA

Atividade citotóxica do MST-312 em células tumorais independente da sua ação
inibidora da telomerase.

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado para a
obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de
Brasília, Faculdade de Ceilândia.
Orientador: Prof. Dr. Diêgo
Madureira de Oliveira

CEILÂNDIA DF

2017

TALES HENRIQUE ANDRADE DA MOTA

Atividade citotóxica do MST-312 em células tumorais independente da sua ação
inibidora da telomerase.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Madureira de Oliveira
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília-UnB
Orientador

Prof.^a Dr^a. Vivian da Silva Santos
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília-UnB

Prof. Dr. Rodrigo Haddad
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília-UnB

CEILÂNDIA DF

2017

Este trabalho é dedicado para pessoas que sofrem com o câncer e para todos que trabalham buscando algum tipo de tratamento para a doença.

Agradecimentos

Primeiramente queria agradecer a minha família por me fazer quem eu sou principalmente a minha mãe Jocilene Alves de Andrade, ao meu pai Jovair Gonzaga da Mota e meu irmão Kaio Andrade da Mota.

Queria agradecer ao meu grupo de pesquisa por me ajudar e me ensinar bastante principalmente ao meu orientador o professor Diêgo, homem no qual me inspiro e que me deu a oportunidade de entrar na área científica, também tenho que agradecer a educação que ele me deu por reconhecer minhas limitações e me ajudar a melhorar.

Agradeço as todos meus amigos, principalmente o Lucas Falcomer e o Gabriel Lopes que fizeram grande parte da minha vida e a todos que passaram pela a minha vida, pois cada um me ajudou a ser quem sou hoje.

“A vantagem de ter péssima memória é divertir-se muitas vezes com as mesmas coisas boas como se fosse à primeira vez.”

Friedrich Nietzsche

Resumo

Mota,A.T. Atividade citotóxica do MST-312 em células tumorais independente da sua ação inibidora da telomerase. 2017. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

O câncer é uma doença muito temida na atualidade e a busca por tratamentos menos agressivos vem crescendo a cada dia, dada a complexidade da doença e a dificuldade em entender seus mecanismos, o que torna a busca por um novo fármaco de extrema importância. O presente estudo avaliou o efeito do MST-312, um fármaco derivado do galato de epigallocatequina, independente da sua atividade já conhecida de inibir a enzima telomerase, em células de carcinoma cervical (HeLa) não tratada, (HeLa NT), e em clones derivados da mesma, HeLa hTERT ko e Controle. Foi realizada inibição da telomerase por meio de transfecção, avaliando a atividade da droga por meio da exposição ao fármaco por 48 horas a diferentes concentrações seguida de avaliação da viabilidade celular por meio de teste de MTT. Ambas as linhagens clonais de HeLa foram sensíveis ao MST-312 e a atividade citotóxica da droga mostrou-se dose dependente com mecanismo de ação independente da inibição da telomerase, uma vez que os efeitos de inibição da telomerase vão aparecer depois de 60 ciclos celulares. Pode-se concluir que o MST-312 diminui a viabilidade celular por uma via independente da inibição da telomerase, havendo outras formas de atuação sobre células tumorais além da encontrada na literatura.

Palavras chaves: MST-312, telomerase, transfecção e telomero

Abstract

Mota,A.T. Cytotoxic activity of MST-312 in tumor cells independent of their telomerase inhibitory action.2017. Graduation Dissertation–Faculty ofCeilândia, University of Brasilia, Brasilia, 2017.

Cancer is a dangerous disease and the search for new treatments has grown even more due to its complexity and the difficulty to understand its mechanisms. .The present study evaluated the effect of MST-312, a drug derived from epigallocatechingallate, independent on its already known activity that is to inhibit the telomerase enzyme in not trasfected cercical carcinoma cells (HeLa NT) or in its clones – hTERT KO and control. Telomerase was inhibited by transfection and drug activity was performed by treating the cells with different concentrations of the drug for 48 hours followed by MTT assay. It was seen that both clones are sensitive to MST-312 and all the cell lines demonstrated sensitivity to MST-312 in a dose dependent way, what suggests a different mechanism besides telomerase inhibition, since the effects of telomerase inhibition appear after 60 cell cycles. In conclusion, it was found that MST-312 may also decrease cell viability through a telomerase inhibition independent pathway.

Keywords: MST-312, trasfection, telomerase and telomero

Lista de tabelas e figuras

Figura 1. Estrutura da telomerase.

Figura 2. Formula molecular do MST-312.

Figura 3. Ilustração esquemática de como o shRNA vai inibir o hTERT em células de HeLa.

Figura 4. Foto da linhagem de HeLa NT.

Figura 5. Sensibilidade da linhagem quando em contato com a puromicina.

Figura 6. Esquema da seleção clonal.

Figura 7. Hela NT em contato com o MST-312.

Figura 8. MTT das linhagens clonais em relação ao MST-312.

Tabela 1. Tabela que mostra todas as menores concentrações tóxicas testadas com o MST-312 e o IC50% de cada linhagem.

Lista de siglas e símbolos

| | |
|-----------------|---|
| AAT | Alogamento Alternativo de Telômero. |
| cDNA | DNA complementar. |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono. |
| CXCR7 | Receptor de chemokina 7 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido. |
| Hela NT | Linhagem de HeLa que não foi tratada. |
| HPV | Papiloma vírus humano. |
| hTERT | Subunidade catalítica da telomerase. |
| hTERT-KO | Células HeLa que sofreram knockout do gene hTERT. |
| hTR | RNA molde da telomerase. |
| IC50 | Concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular. |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. |
| IQGAP | IQ Motif Containing GTPase Activating Protein. |
| LPA | Leucemia Promielocítica Aguda. |
| MCF7 | linhagem celular referente ao câncer de mama. |
| MCT | Menor concentração tóxica . |
| MDA MB 231 | linhagem celular referente ao câncer de mama. |

| | |
|-----------------------|---|
| miRNA | Micro RNA. |
| mRNA | RNA mensageiro . |
| MST 312 | Inibidor da telomerase. |
| MTT | 3-(-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio. |
| NF- κ B | Fator nuclear kappa B. |
| OMS | Organização mundial de saúde. |
| SFB | Soro fetal bovino. |
| shRNA | Short hairpin RNA. |
| TRF2 | Fator de repetição ligado ao telômero. |
| Wnt/ β -catenin | Wingless-Type MMTV Integration Site Family, que ajuda na sinalização da β -catenin. |

Sumário

| | |
|---------------------|----|
| Introdução | 12 |
| Justificativa | 17 |
| Objetivos | 18 |
| Materiais e Métodos | 18 |
| Resultados | 19 |
| Discussões | 25 |
| Conclusão | 29 |
| Bibliografia | 30 |

Introdução

1.1 Processo de imortalização

A célula normal tem um potencial finito de se dividir e quando ela chega ao limite das suas divisões essa se torna senescente ou entra em crise. No primeiro caso, a célula perde a capacidade de proliferar, entretanto continua viável (TOLEDO et al., 2005), já no segundo caso é iniciado o processo de morte celular. Entretanto pode acontecer das células driblarem essas possibilidades e adquirirem a capacidade de se dividir infinitamente, ou seja, ficarem imortais (WEINBERG, 2008. ;A PICKETT; REDDEL, 2015).

No processo de imortalização os telômeros têm um importante papel de manter a estabilidade do DNA e funcionar como um relógio biológico. Eles são complexos formados de nucleoproteínas localizados no final dos cromossomos ricos em guanina tendo um comprimento que varia entre 10-15 quilo bases (BASU et al., 2013; FEIJOO et al., 2014).

Em 1978 os telômeros foram estudados por Joseph Gall e Elizabeth Blackburn, o primeiro era um biólogo celular americano e a segunda era uma renomada bióloga molecular estadunidense. Os telômeros são estruturas heterocromáticas que contém proteínas e DNA repetitivo. Os trabalhos de Herman Müller e Barbara Mc Clintock foram os primeiros a apoiar a existência de alguma estrutura que protegeria o DNA localizado nos finais dos cromossomos. Eles observaram que cromossomos quebrados foram fundindo-se consigo mesmos, mas não com terminais naturais, observando assim, a função de proteção dos telômeros. Dessa forma, além de proteger o DNA em sua reparação ou em eventos de combinação, os telômeros também mantêm a estabilidade cromossômica (FEIJOO et al., 2014).

A cada divisão celular os telômeros encurtam e dessa forma sua limitada capacidade proliferativa chega a seu limite, fazendo com que haja uma sinalização celular que pode desencadear os mecanismos de senescência e apoptose. Deste modo o telômero funciona como um relógio biológico que é caracterizado por impor fim à possibilidade de duplicação (WEINBERG, 2008; BAR e BLASCO, 2016).

Mais de 85% dos tipos de imortalização que acontecem para o surgimento dos tumores são devidos a expressão da enzima chamada de telomerase (GURUNG et

al., 2014), assim ela consegue manter a capacidade proliferativa da célula por deixar os telômeros viáveis (CESARE E REDDEL, 2010) o que é um dos fortes fatores para que ocorra o câncer. A telomerase é uma ribonucleoproteína constituída de uma subunidade catalítica com ação de transcriptase reversa (hTERT) e uma subunidade de RNA que atua como molde (hTR) (HU, 2013; SEKARAN et al., 2014). A hTERT é uma proteína responsável pela atividade enzimática da telomerase, contendo um sítio com atividade de transcriptase reversa (RT). O seu componente RNA de telomerase humana (hTR) tem 451 nucleotídeos com vários domínios funcionais em adição a uma sequência de molde utilizadas de código para o DNA telomérico rico em guanina (fig. 1).

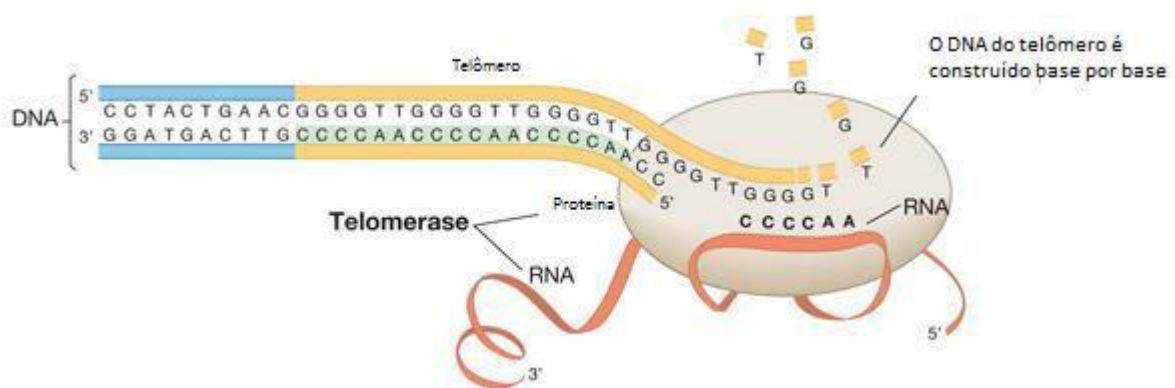


Fig.1: Estrutura da telomerase: complexo enzimático terminal transferase-ribonucleoprotéico. Fonte: <http://www.spektrum.de/news/verkappt-zur-unsterblichkeit/1009938> (Acessado em 12/03/2017 às 23,02h)

A telomerase não está ativa normalmente nas células somáticas, entretanto nas células germinativas e no período embrionário é possível identificar sua atividade, contudo essa é reprimida no decorrer da diferenciação celular no caso do período embrionário (SEKHRI, 2014; KARP, 2005). O hTR é detectado nas diversas células do corpo humano, já no caso do hTERT sua expressão é restrita a células com atividade de telomerase mensurável, sendo este um fator limitante para o funcionamento da enzima que a torna um alvo farmacológico interessante uma vez que mais da metade dos cânceres apresentam atividade da telomerase.

1.2 Epidemiologia do câncer

O câncer representa um grande problema de saúde no Brasil e no mundo. Com base nos dados da OMS é indiscutível que o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública, especialmente em países subdesenvolvidos onde é esperado que o impacto da doença na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025 (INCA, 2016). A estimativa mundial da doença apontou mais de 14 milhões de casos dos quais mais de 60% foram observados em países em desenvolvimento, e a situação piora quando dos oito milhões dos óbitos previstos 70% corresponde à população dos países pobres, dessa forma é possível caracterizar o câncer como problema de saúde público mundial (INCA 2016).

Podendo ser caracterizada como uma doença multifatorial, (XIU et al., 2015), o câncer tem vários aspectos envolvidos, como histórico familiar, exposição crônica a substâncias danosas carcinogênicas, alimentação, prática de esportes físicos e um dos mais importantes: a idade (INCA 2016).

A alimentação adequada pode ajudar na prevenção do câncer. Uma nutrição inadequada pode estar ligada com 20% dos casos de câncer nos países em desenvolvimento como o Brasil, e por aproximadamente 35% das mortes pela doença (INCA, 2016). Se a população adotasse uma alimentação adequada ligada com a prática de exercício físico e com o peso corporal adequado, um terço dos cânceres mais comum poderiam ser evitados (INCA, 2016).

A linhagem celular denominada HeLa é originária de câncer cervical e foi a primeira linhagem utilizada em pesquisa (RAHBARI et al., 2009) e até hoje é uma das mais utilizadas. As células dessa linhagem foram coletadas a primeira vez em 1951, da paciente americana Henrietta Lacks.

O câncer de colo de útero é o terceiro tumor mais frequente em mulheres só perdendo para o câncer de colo retal e o de mama e é a quarta causa de morte em mulheres pelo câncer no Brasil (INCA 2016). Hoje a principal causa do câncer cervical é a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), esse vírus pode causar câncer por induzir a produção de genes supressores de tumor como o gene E7 e o E6. O E7 age

inibindo a atividade da pRb e o E6 age se ligando a proteína p53 e o complexo formado por p53 e E6 é degradado. Dessa forma a perda da função dessas duas proteínas, responsáveis por ajudar na superação tumoral, faz com que a célula possa ter uma progressão do tumor gerando o câncer (Farshidet al, 2010). Entretanto com o desenvolvimento da medicina e com o teste conhecido como papanicolau é possível identificar a doença antes da fase invasiva e posto isso é possível quando identificada de forma precoce em quase todos os casos curar a doença (INCA 2016).

A busca de novas terapias para o câncer hoje é de extrema relevância e um método de tratamento que é comumente utilizado é a quimioterapia. O MST-312 é uma droga descrita recentemente que pode um dia ser usada no tratamento para o câncer, contudo é necessário descobrir como a droga age para que dessa assim essa possa ser utilizada de forma segura e mais efetiva possível.

1.3 O inibidor da telomerase MST-312

Como o câncer é uma doença antiga (DAVID & ZIMMERMAN, 2010), existem varias pesquisas que buscam o tratamento mais eficiente. Uma alternativa são os inibidores da telomerase, que seriam perfeitos para terapia farmacológica do câncer. Contudo existe um pequeno percentual restante de células que consegue manter a estrutura telomérica por meio de mecanismos independentes de telomerase conhecidos como *alongamento alternativo de telômero* (AAT) (Chenet al., 2010 ;Hujet al., 2012), havendo, portanto, uma rota de escape para as células tratadas com tais inibidores. Apesar disso, a inibição da atividade da telomerase continua sendo uma possibilidade farmacológica interessante, desde que o tratamento não leve a uma rápida conversão do tumor para o fenótipo AAT.

O MST-312 é um composto sintético baseado nas moléculas de galato de epigallocatequina (Figura 2) que é uma molécula extraída do chá verde e essa apresenta uma ação inibidora da enzima da telomerase (SEIMIYA *et al.*, 2002). Outros trabalhos já demonstraram que a droga possui ação antiproliferativa a curto prazo, o que não deve envolver erosão telomérica, induzindo uma parada do ciclo celular e apoptose (SERRANO *et al.*, 2011; GURUNG *et al.*, 2014; GURUNG *et al.*, 2015), mas não fica claro se essa ação está relacionada com a ação inibitória da telomerase ou se a via seria outra independente dessa enzima. Posto isso um estudo com a proposta

de entender melhor os mecanismos dessa droga em células que não tem a expressão da telomerase poderia ajudar a entender melhor os seus mecanismos de atuação além do conhecido de inibir essa enzima e determinar sua atividade tóxica em células de HeLa.

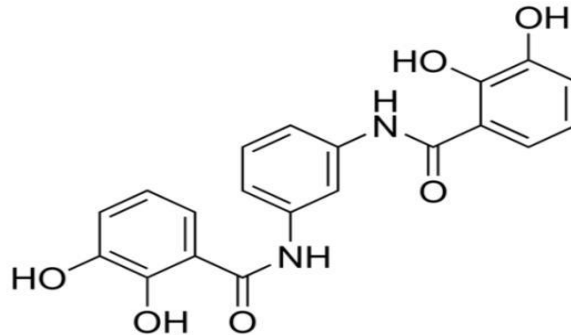


Figura 2. Estrutura química do MST-312, de acordo com o fabricante (Acessado em 15/03/2017 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3949?lang=pt®ion=BR>).

1.4 Transfecção celular

Hoje em dia é sabido que o silenciamento gênico ocorre como um processo de defesa para os seres vivos. Os mecanismos de silenciamento podem ser considerados como recentemente descritos e são mediados por fitas de microRNA (miRNA) com especificidade para algum RNA mensageiro (mRNA), sendo que quando esse é reconhecido pelo miRNA ocorre o processo de repressão fazendo com que ele seja inibido ou clivado e que posteriormente não tenha a produção da proteína ou seja o impedimento da tradução (FRANÇA *et al.*, 2010). Como resulta em um forte efeito de inibição gênica, o silenciamento gênico vem sendo amplamente utilizado como ferramenta em células de câncer (BERTRAND *et al.*, 2002), uma vez que tem alta especificidade e é considerada uma técnica potente. O mecanismo utilizado nesse trabalho está demonstrado na figura 3.

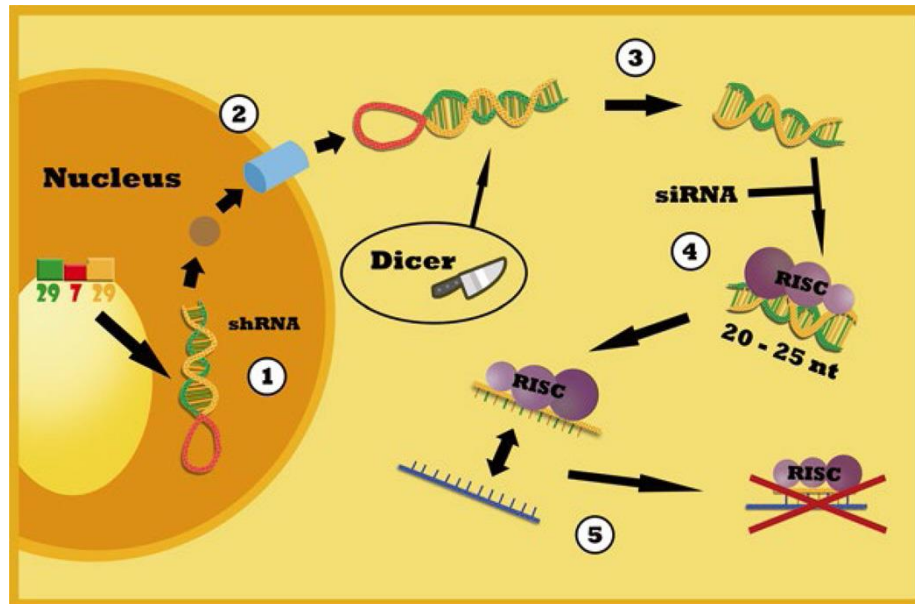


Figura3. Ilustração esquemática de como o shRNA vai inibir o hTERT em células HeLa. 1PrimiRNA é produzido no núcleo devido ao gene que foi introduzido ao material genético da célula devido a transfecção. 2Drosha e Parsha através de uma reação enzimática transforma o primárioRNA em prémiRNA, o qual depois de transformado consegue atravessar para o citoplasma devido a exportina 5. 3 A Dicer reconhece o prémiRNA e por meio de outra reação enzimática o transforma em um RNA menor de 20 a 25pb chamado de miRNA. 4 O complexo da RISC juntamente com proteínas argonautas e outras proteínas podem reconhecer esse miRNA e o direcionar para o mRNA complementar. 5 Ao se ligar ao mRNA complementar pode acontecer desse ser silenciado ou degradado dessa forma impedindo a tradução e fazendo assim o silenciamento gênico (SALAZAR et al., 2014).

• Justificativa

Tendo em vista a complexidade do câncer, existe a necessidade de descobrir novas estratégias terapêuticas para melhorar a eficiência dos tratamentos na área de oncologia. O MST-312 tem alto potencial de aplicação farmacológica, mas para isso é necessário entender melhor seu possível mecanismo em células tumorais. Além disso, estudos clínicos cada vez mais frequentes vêm demonstrando as vantagens de terapias anti-telomerase(ELMORE; HOLT, 2007), tais estudos baseiam-se no efeito em longo prazo do uso de inibidores da enzima, mas pouco se sabe sobre os mecanismos de toxicidade direta dessas drogas, e o fato dessa toxicidade se manifestar antes do tempo necessário ao encurtamento dos telômeros indica uma ação independente da telomerase.

3 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo é determinar se a atividade citotóxica em curto prazo do MST-312 independe da sua ação inibidora da telomerase.

3,1 Objetivos específicos

Objetivos Específicos

- Estabelecimento e caracterização de clones estáveis knock-out para telomerase a partir de células HeLa.
- Comparação dos efeitos tóxicos do MST-312 entre clones positivos e negativos para telomerase.

4. Materiais e Métodos

4.1 Cultura de células

As células HeLa foram cultivadas em placas plásticas de 10 cm de diâmetro, específicas para esse fim, a 37°C em meios de cultura adequados suplementados 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 Produção de clones estáveis knock-out para telomerase

Um plasmídeo contendo sequência relativa ao shRNA para o gene hTERT localizado no cromossomo 5p15.33 (porção catalítica da telomerase humana) foi usado no protocolo de transfecção, segundo instruções do fabricante. A seleção foi feita, inicialmente, por exposição à puromicina, uma vez que o plasmídeo também contém o gene que confere resistência a esse antibiótico. Posteriormente, por diluição seriada, foram feitas culturas monoclonais (a partir de célula única).

4.3 Seleção clonal

As células que conseguiram sobreviver a transfecção foram tripsinizadas e contadas e ao fazer um cálculo prévio para colocar apenas uma única célula por poço essas foram colocadas em placa de noventa e seis poços de modo que apenas uma célula ficara em cada poço, as células que conseguiram sobreviver e conseguiram

formar colônias a partir de uma única célula foram chamadas de clones e essas foram tripsinizadas da placa de noventa e seis poços para placas de 3,5ml e depois foram congeladas para manter o clone e também utilizadas nos demais experimentos.

4.4 Análise de viabilidade celular pelo teste do MTT

Para atestar o efeito citotóxico do MST-312 independente da telomerase, as células oriundas do protocolo de transfecção foram submetidas a tratamento por 72 horas com a droga em concentrações crescentes. As células foram semeadas em placa de 96 poços e a viabilidade será mensurada (em grupos de 8 poços, referentes à cada concentração que será usada) pelo ensaio de MTT. O meio de cultura foi trocado e o MTT dissolvido em tampão fosfato foi adicionado em cada poço (1 mg/ml). Após duas horas de incubação, as células foram lisadas por adição de 100 µL de dodecil-sulfato de sódio a 20% (p/v) em dimetilformamida a 50% (v/v). Para quantificar a viabilidade, a placa foi submetida à espectrofotometria e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 630 nm .

4.5 Análise dos dados

Todos os dados receberam tratamento estatístico adequado, sendo expressos como média e desvio padrão, ou mediana e percentil, de acordo com a distribuição, e analisados por testes paramétricos ou não paramétricos, na mesma dependência. Os testes escolhidos foram descritos na apresentação dos resultados e os valores de p adotados como estatisticamente significantes nas análises foram aqueles inferiores a 0,05. A determinação da IC_{50%} foi feita a partir de regressão não-linear dos dados de toxicidade.

5.0 Resultados

A linhagem de HeLa NT, sem nenhum tratamento (Figura 4), foi submetida à seleção com antibiótico conhecido como puromicina, para saber qual concentração desse seria usada para que todas as células morressem, sendo posteriormente realizado a transfecção.

De acordo com o experimento retratado na figura 5, em que as células ficaram expostas à puromicina por 48 horas de tratamento é visto que a linhagem celular utilizada tem grande sensibilidade ao antibiótico uma vez que o MTT, teste que tem como o princípio analisar a viabilidade de uma cultura, mostrado pela imagem 5A demonstrou que em concentrações de $0,75\mu\text{M}$ praticamente todas as células já haviam morrido.

Então para ter certeza de que todas as células fossem mortas pela puromicina foi utilizada uma concentração de $920\mu\text{M}$ por um período de 48 horas, e como resultado todas as células de HeLa que foram expostas ao antibióticos morreram, (figura 5 Imagem C) em comparação ao controle, (figura 5 Imagem B), que não foi tratado com nenhuma substância pelo mesmo período de tempo.

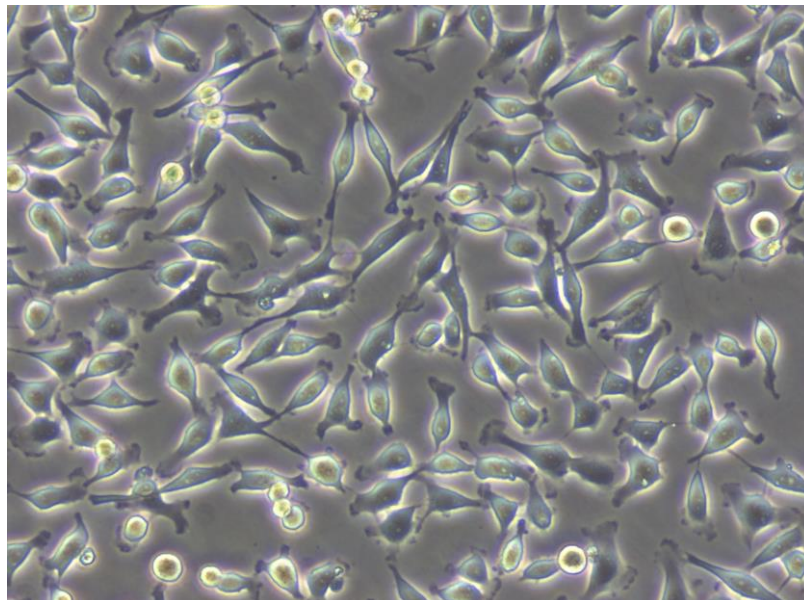


Figura 4. Foto da linhagem HeLa na objetiva de 10x sem nenhum tratamento.

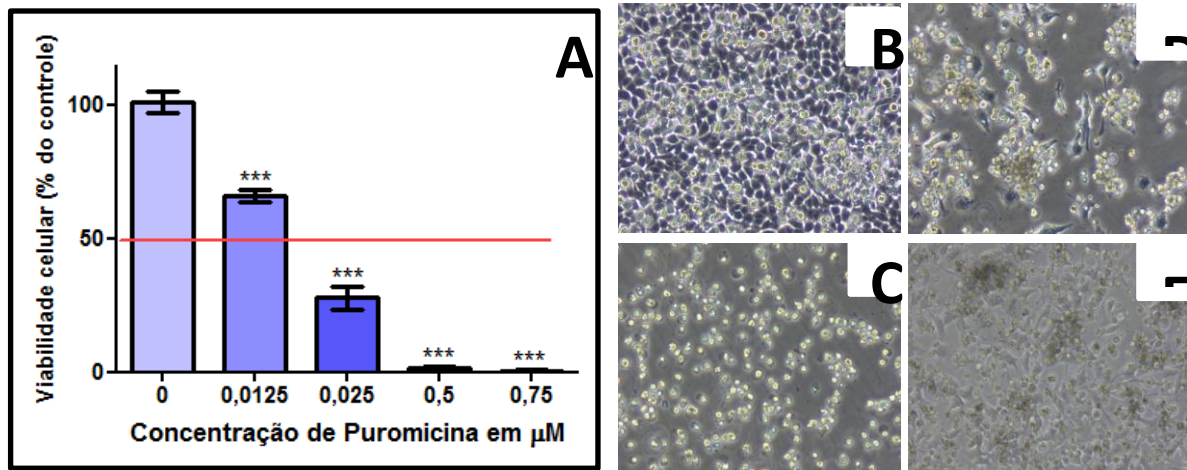


Figura 5. Teste com o antibiótico conhecido como puromicina. Imagem A. Atividade dose-dependente da Puromicina sobre as células de HeLa NT tratadas por um período de 48h. Os dados estão em percentual em relação ao controle que a concentração é zero (0), e as barras mostram as medianas dos grupos com o desvio padrão. Para comparação entre a coluna controle, com as demais colunas, foi usado o teste Anova, teste paramétrico, pois os dados possuem distribuição normal, com pós-teste de Dunnett, os asteriscos significam dados com relevância estatística ($P > 0,05$). Imagem B. Teste de quarenta e oito (48) horas com a puromicina poço controle. Imagem C. 48 horas com a puromicina na concentração de $920\mu\text{M}$ é observado morte total das células. Imagem D. Células de HeLa transfetadas com o plasmídeo que contém o gene que vai inibir a hTERT e um gene de resistência da puromicina, submetidas ao tratamento com puromicina a $920\mu\text{M}$ por um período de 96 horas. Imagem E. Células de HeLa que foram transfetadas com o plasmídeo que continha apenas o gene para resistência da puromicina, chamado de plasmídeo controle, as células foram submetidas ao tratamento com puromicina a $920\mu\text{M}$ por um período de 96 horas.

Por conseguinte as células de HeLa foram divididas em duas placas, a primeira placa recebeu o plasmídeo “hTERT” que é responsável por inibir o gene do hTERT e também apresenta o gene que deixa a célula resistente a puromicina, já a segunda placa recebeu o plasmídeo controle que apenas contém o gene que deixa a célula resistente ao antibiótico. Na concentração de $920\mu\text{M}$ e depois de 96 horas de tratamento com a puromicina, ou seja, o dobro do tempo de exposição em relação ao teste feito na figura 5 imagem C é observado que tanto as células que foram tratadas com o plasmídeo hTERT quanto as células submetidas ao plasmídeo controle conseguiram sobreviver (Imagem 5 figuras D e E respectivamente), sendo assim um forte indicativo que a transfecção foi eficiente.

Com as células transfetadas foi realizado o procedimento de seleção clonal (Figura 6) em duas placas, uma com as células que foram submetidas ao plasmídeo hTERT e a outra para as células submetidas ao plasmídeo controle. Dos 96 poços que foram utilizados para o experimento foram selecionados onze clones da placa hTERT,

esses serão chamados de clones hTERT-KO, que são células que sofreram knock-out do gene hTERT e cinco clones da placa que foi utilizada o plasmídeo controle.

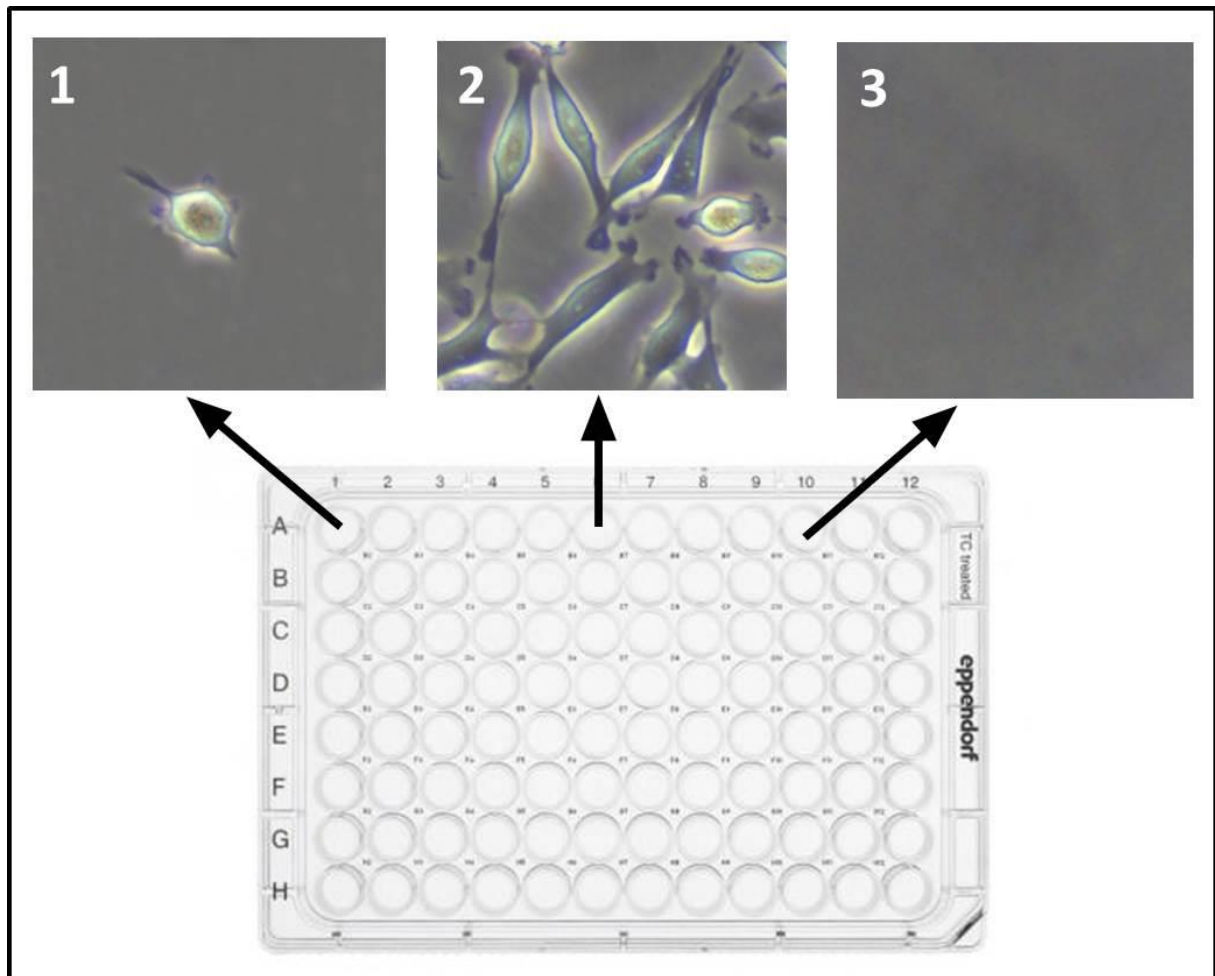


Figura 6. Imagem da placara de seleção clonal, o numero 1 indica que tem apenas uma célula por poço. O numero 2 indica que ficaram mais células por poço e o numero 3 indica que não ficou nenhuma célula no poço.

Após o término da seleção clonal foi escolhido para a realização de MTT, um clone da placa controle, um da placa hTERT e a HELA NT, ou seja, células que não foram transfetadas. A escolha dos clones foi feita com base na observação de suas características como o crescimento e a morfologia de suas células.

Na linhagem de HeLa NT não foi visto efeito do DMSO (Figura 7) sobre a viabilidade celular quando comparado com o grupo contendo apenas meio, contudo no clone hTERT-KO e no clone controle foi observado um efeito tóxico do diluente seguido de um efeito protetor em concentrações mais baixas da droga como demonstrado na figura 8.

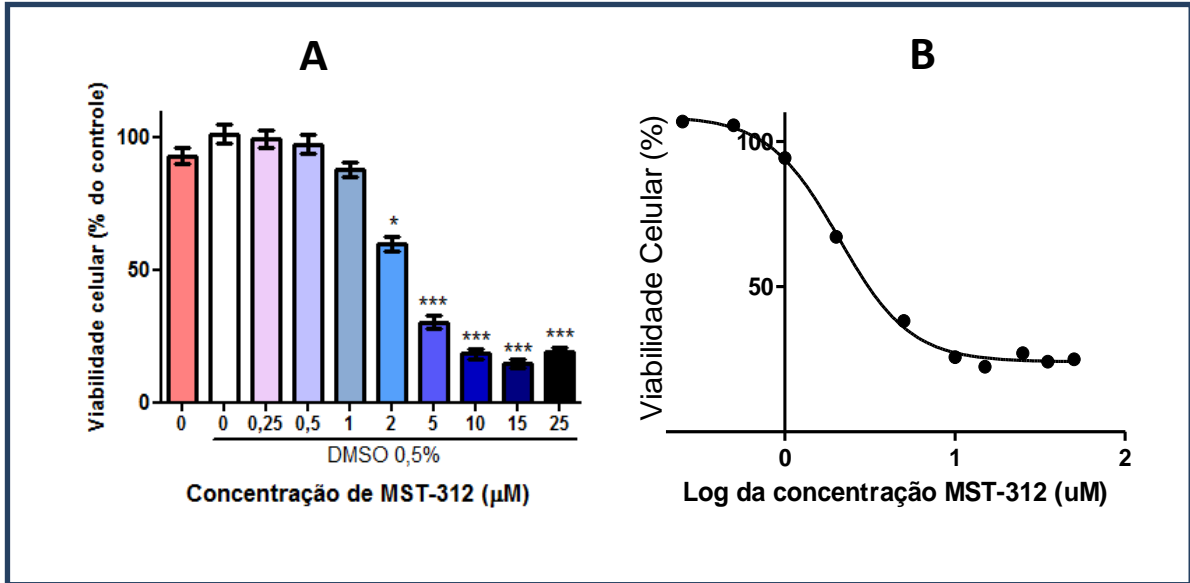


Figura 7: (A) Atividade dose-dependente do MST-312 sobre as células do clone de HeLa NT tratadas por um período de 48h. Os dados estão em percentual em relação ao controle, e as barras mostram as medianas dos grupos com o desvio padrão. Utilizando o Teste t para comparar as duas primeiras colunas, que são os controles, temos valor de P igual a 0,5277, não sendo dessa forma um valor significativo ($P < 0,05$). Para comparação entre a segunda coluna, controle de DMSO, com as demais colunas, foi usado o teste One Way ANOVA, teste paramétrico, pois os dados possuem distribuição normal, com pós-teste de Dunnett. Onde nas concentrações de 2 µM, 5µM, 10µM, 15µM e 25µM apresentaram ser um valor significativo. (B) Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células de HeLa NT. 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 0,9922, sendo bem representativa dos dados ($1 > R^2 > 0,95$) e com $IC_{50\%}$ igual a 3,0942µM

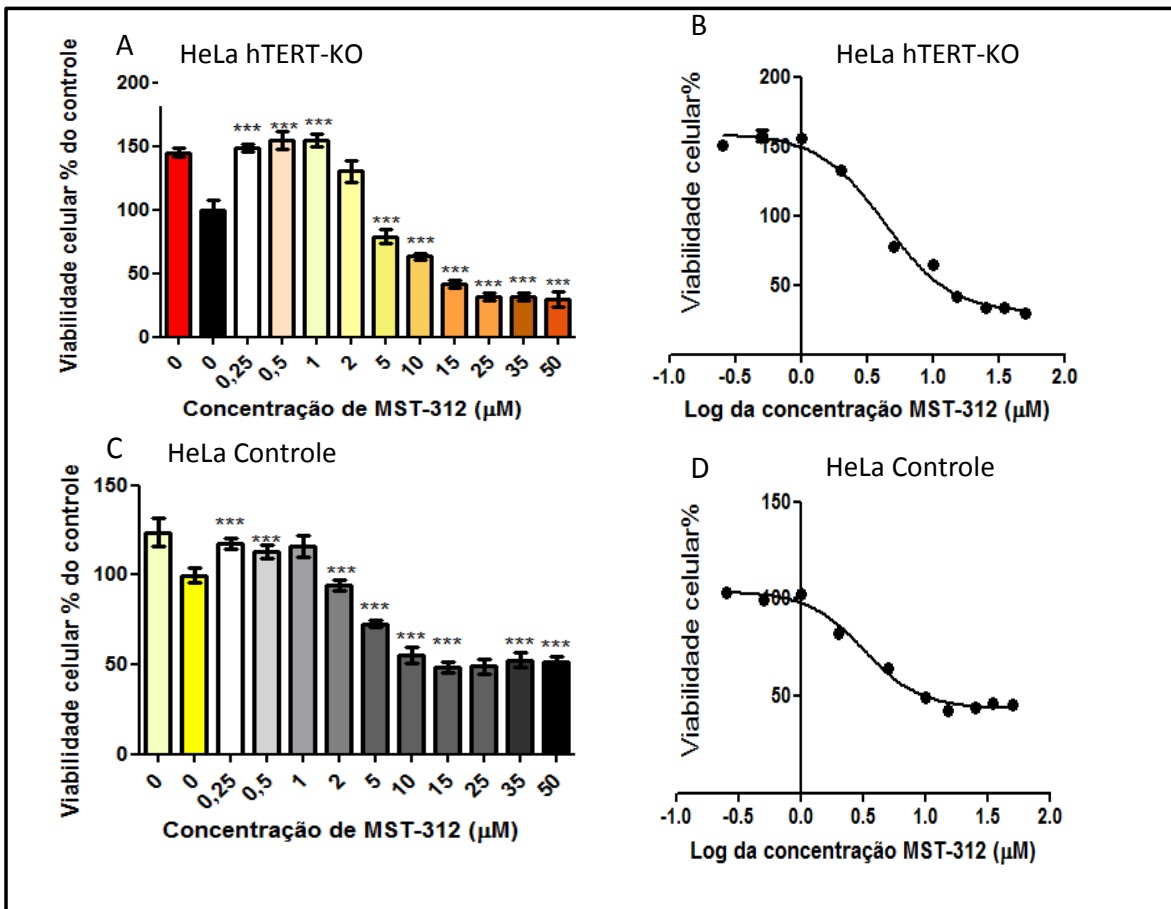


Figura 8: Atividade do MST-312 sobre as células clonais tratadas por 48 horas. Imagem A. Clone de HeLa hTERT-KO. Os dados estão em percentual em relação ao controle, e as barras mostram as medianas dos grupos com o desvio padrão. Utilizando o Teste t para comparar as duas primeiras colunas, que são os controles, temos valor de P igual a 0,0003, sendo dessa forma um valor significativo ($P < 0,05$). Para comparação entre a segunda coluna, controle de DMSO, com as demais colunas, foi usado o teste Oneway ANOVA, teste paramétrico, pois os dados possuem distribuição normal, com pós-teste de Dunnett. Onde as concentrações de 0,25µM, 0,5µM, 1µM, 5µM, 10µM, 15µM, 25µM, 35µM e 50µM tiveram valor significativo. (B) Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células de HeLa hTERT-KO. Gráfico em função logarítmica, concentração em log em relação à viabilidade celular. A viabilidade diminui a cada unidade de concentração que se aumenta a concentração da droga. O valor de R^2 foi igual a 0,9749, sendo bem representativa dos dados ($1 > R^2 > 0,95$) e com $IC_{50\%}$ igual a 11,42µM. (C) Clone de HeLa controle. Os dados estão em percentual em relação ao controle, e as barras mostram as medianas dos grupos com o desvio padrão. Utilizando o Teste t para comparar as duas primeiras colunas, que são os controles, temos valor de P igual a 0,0007. Para comparação entre a segunda coluna, controle de DMSO, com as demais colunas, foi usado o teste Oneway ANOVA, teste paramétrico, pois os dados possuem distribuição normal, com pós-teste de Dunnett. Onde as concentrações de 0,25µM, 0,5µM, 2 µM, 5µM, 10µM, 15µM, 35µM e 50µM tiveram valor significativo. (D) Regressão não linear entre concentração e resposta sobre as células de HeLa controle. Gráfico em função logarítmica, concentração em log em relação à viabilidade celular. A viabilidade diminui a cada unidade de concentração que se aumenta a concentração da droga. O valor de R^2 foi igual a 0,9669, sendo bem representativa dos dados ($1 > R^2 > 0,95$) e com $IC_{50\%}$ igual a 9,9496µM.

Com esses dados ficou possível perceber que o efeito da droga nas linhagens foi dose dependente, mas não apenas isso, pois também é notado que os clones apresentam maior resistência ao MST-312 que a linhagem de HeLa NT uma vez que o $IC_{50\%}$ na linhagem que não foi submetida à seleção clonal é de $3,0942\mu M$ e as linhagens clones hTERT-KO e a controle tiveram $IC_{50\%}$ de $9,9466\mu M$ e $11,4249\mu M$ respectivamente. Outra observação possível é que o DMSO apresentou efeito tóxico nas linhagens clone, mas não na HeLa NT e ainda é possível observar que em baixas concentrações o MST-312, nessas linhagens que foram mais sensíveis ao diluente, apresenta um efeito protetor em baixas concentrações como na de $0,25\mu M$ e $0,5\mu M$.

Os valores de MCT (menor concentração tóxica) e de $IC_{50\%}$ estão abaixo:

| Linhagens | MCT | $IC_{50\%}$ |
|---------------|----------|----------------|
| HeLa NT | $1\mu M$ | $3,0942\mu M$ |
| HeLa hTERT-KO | $2\mu M$ | $11,4249\mu M$ |
| HeLa controle | $1\mu M$ | $9,9466\mu M$ |

Quadro 1: Menor concentração tóxica (MCT) dentre as testadas que apresentou diferença significativa para o controle e $IC_{50\%}$ de cada linhagem.

6. Discussões

A transfecção gênica é uma técnica que utiliza de lipossomas visto que essas são capazes de serem englobadas pelas células pelo mecanismo de endocitose e posteriormente são degradadas deixando o plasmídeo livre no citoplasma para que este consiga ir para o núcleo e que posteriormente coloque o gene de interesse no DNA. Dessa forma diversos outros trabalhos já utilizam do método de transfecção gênica como o do Su, Liu e Song (2017) que utiliza a técnica para fazer o Knock-out do gene IQGAP e assim demonstra que em células com a ausência desse gene tem a proliferação celular inibida pelo bloqueio da via Wnt/ β -catenin.

A transfecção realizada nesse trabalho foi feita com o intuito de inibir o gene da telomerase e para controle de transfecção foi utilizado no plasmídeo um gene de resistência a puomicina para ser usada como controle. As células de HeLa apresentaram ser bem sensível a puomicina morrendo praticamente todas as células na concentração de $0,75\mu M$. Assim posto para ter certeza que todas as células fossem

morrer foi utilizada a concentração da droga de 920 μ M e de acordo com a Figura 5 C é observado que realmente todas as células morreram.

Alguns trabalhos já utilizaram da puromicina como controle de transfecção como o do Salazar et al. (2014) onde ele descreve um protocolo utilizado para o silenciamento estável do receptor CXCR7 utilizando de shRNA. No trabalho dele as linhagens utilizadas foram as de MCF-7 e a LNCaP sendo que a concentração utilizada de puromicina foi de 1840 μ M, no presente trabalho a concentração utilizada do antibiótico foi de 920 μ M ou seja a célula de HeLa é mais sensível a puromicina do que a MCF-7 e a LNCaP.

Na figura 5 imagens D e E as células ficaram sob o efeito da Puromicina na concentração 920 μ M por um período de 96 horas, ou seja, o dobro do tempo que ficaram expostas no período de seleção, desta forma como as células ficaram vivas foi possível inferir que a transfecção deu certo, pois é um forte indicativo que o plasmídeo provavelmente conseguiu entrar na célula para passar o gene de resistência da puromicina e também o gene responsável por inibir o hTERT.

A seleção clonal foi feita em duas placas uma para as células da transfecção hTERT e outra para as células da placa controle. Na placa hTERT os clones que cresceram de uma única célula e conseguiram virar colônia foram onze e da placa controle foram cinco. Dos clones que foram feitos, foi selecionado um clone da transfecção hTERT e um clone da transfecção controle com base nas suas características.

Ao analisarmos a figura sete é notado que quando o MST-312 atua na linhagem de HeLa NT, temos um IC_{50%} de 3,0942 μ M e ainda é notado um efeito tóxico significativo nas concentrações de 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M e 25 μ M, apresentando efeito citotóxico dose dependente. O efeito do MST-312 demonstrado não deve ser em razão da erosão dos telômeros, entretanto pode ser um efeito por inibição da telomerase que repercute em outras vias de sinalização, por isso foi necessário fazer a transfecção para inibir essa enzima, para ter certeza se esse efeito é verdadeiro.

Se o efeito do MST-312 fosse apenas de inibir a telomerase, esse seria uma droga que seria capaz de atuar em mais de 80% dos diferentes tipos de câncer isso porque o restante aumenta seus telômeros pelo alongamento alternativo, não tendo

ação, nas células normais do indivíduo, uma vez que essas não têm a enzima telomerase ativa, exceto por algumas exceções como as células germinativas, algumas células do sistema imunológico e etc. Outros trabalhos já demonstraram o efeito citotóxico do MST-312. Os resultados deles mostraram que quando submetido ao tratamento de curto prazo a droga exerceu um efeito citotóxico dose dependente, o que levou as células de leucemia promielocítica aguda (LPA) a fazer uma parada em G2/M no ciclo celular. Além disso a droga ocasionou a indução do apoptose mediado por caspases, fazendo uma redução significativa na atividade da enzima telomerase. A apoptose aconteceu devido a atividade da droga em suprimir a atividade do NFkB, que tem ação antiapoptotica (FATEMI; SAFA; KAZEMI, 2015).

Outro estudo que avaliou os efeitos do MST-312 mostrou sua atividade sobre os telômeros e uma possível atividade que gera danos no DNA em células de câncer de mama, MDA MB 231. Nesse estudo eles demonstraram que o MST-312 não só diminuiu a atividade da telomerase como também induziu a disfunção telomérica e a parada do crescimento celular. O MST-312 também na linhagem MDA MB 231 ocasionou uma infra regulação da proteína TRF2 que é uma proteína que é responsável por proteger os telômeros e reduziu a expressão de genes responsáveis pela reparação do DNA (Gurung et al., 2015).

A parada no ciclo celular pode ser considerado um mecanismo de auto proteção visto que esse gera mais tempo, uma vez que se a célula tiver algum dano no DNA essa tenha o tempo necessário para se reparar de forma eficiente e voltar à ativa retomando o ciclo celular. Quando o dano não pode ser reparado a célula entra em senescência ou apoptose e isso pode ser um possível mecanismo de ação do MST-312 (FATEMI; SAFA; KAZEMI, 2015).

Como a HeLa NT é normalmente considerada uma célula telomerase positiva (Wang et al. 2017), foi feito outro MTT nos clones hTERT-KO e controle com o MST-312, e nessa etapa foi possível avaliar uma pequena diferença entre os clones analisados e a HeLa NT, o IC_{50%} nas duas linhagens foram um pouco maior, 11,4249µM e 9,9466µM, que no da HeLa NT, 3,092µM. Dessa forma levou a suspeita que o intenso processo de seleção clonal pode ter selecionado células mais resistentes a agentes externos em geral, o que inclui o MST-312.

Outra observação que pode ser feita é que o controle utilizado no MTT, DMSO, apresentou diferença significativa quando comparado as placas clone com a de HeLa NT, pois na HeLa NT o composto não apresentou ser tóxico mas nas linhagens dos clones ele apresentou grande diferença estatística por matar consideravelmente as células quando comparado com as concentrações menores testadas de MST-312, 0,25 μ M e 0,5 μ M, onde nessas concentrações o efeito do MST-312 parece proteger contra o efeito tóxico do DMSO. Uma possível explicação do porque ocorre esse efeito protetor é porque o MST-312 é um composto derivado do galato de epigallocatequina que é um composto conhecido por ser um bom antioxidante (Morais et al., 2009) e por o DMSO ter a característica de conseguir transportar moléculas através das membranas (Galvão et al., 2014) ele pode transportar o MST-312 para dentro das células e em pequenas concentrações essa droga pode agir como antioxidante proporcionando o efeito protetor visto nesse trabalho.

O MST-312, portanto, tem um efeito citotóxico dose dependente o que ficou evidenciado nas figuras 7 e 8, contudo era esperado que as células hTERT-KO fossem mais resistentes em comparação ao clone controle e a HeLa NT pois a linhagem trasfectadas para inibir o gene do hTERT não tem a expressão da telomerase. Entretanto o que aconteceu foi que não teve diferença significativa do clone controle quando comparado ao clone hTERT-KO, e a diferença dos clones para a HeLa NT também não foi significativa.

Em trabalhos anteriores já foi citado que em longo prazo o MST-312 atua promovendo erosão telomérica e morte celular (MORAIS et al., 2017) e a curto prazo a inibição da telomerase mediada pela droga influenciava alguma via de sinalização como a supressão da via do NF- κ B que levaria as células a senescência ou morte celular (FATEMI; SAFA; KAZEMI, 2015 ; MIAO et al., 2016), todavia nesse trabalho mesmo em células que não tem atividade da telomerase o MST-312 em doses mais elevadas e a curto prazo levou a morte celular no grupo testado, (figura 8A), sugerindo que a atividade citotóxica dessa droga independe dessa enzima e das vias de sinalização que está pode estar conectada, mostrando que o MST-312 se um dia for utilizado como um quimioterápico, pode ser utilizado não só em tumores que fazem o uso do mecanismo da telomerase para alongamento dos telômeros, mas também em

células que fazem o utilizam o AAT, ou seja amplificando sua utilidade casa um dia seja utilizado na clínica.

Estudar a atividade do MST-312 independentemente da sua atividade de inibir a telomerase é de extrema relevância uma vez que esse composto um dia pode ser utilizado como um quimioterápico.

7. Conclusão

Nesse estudo é possível inferir que foram criados clones estáveis knock-out para telomerase a partir de células HeLa, também foi observado que o MST-312 apresentou efeito citotóxico dose dependente nas linhagens de HeLa NT, clone hTERT-KO e clone controle sendo que esse efeito não foi por inibir a telomerase, pois não teve tempo de completar ciclos suficientes para a enzima ficar inibida.

Foi observado que o mecanismo que os clones utilizaram para ficar resistente a puromicina pode estar relacionado com a resistência dos mesmos ao MST-312 quando comparados com a HeLa NT. Também é possível dizer que a atividade em curto prazo da droga parece ser independente da atividade de inibir a telomerase uma vez que o composto apresentou potencial semelhante em todas as linhagens testadas o que abre novas possibilidades, pois a ação independente da telomerase amplia o potencia de aplicação do MST-312 como antineoplásico uma vez que esse age da mesma forma em células telomerase negativas e em positivas, assim a droga pode ter uma atuação relevante também em células que utilizam o mecanismo de alongamento alternativo de telômeros

8. Bibliografia

A PICKETT, Hilda; REDDEL, Roger R. Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 22, n. 11, p.875-880, 4 nov. 2015.

BAR, C.; BLASCO, M. A. Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases. **F1000Research**, v. 5, n. 89, p. 1-11, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.7020.1

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 GastroenterolHepatol*, v. 7, p. 733–748, Novembro 2013.

BERTRAND, Jean-rémi et al. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 296, n. 4, p.1000-1004, ago. 2002.

CESARE, A. J.; REDDEL, R. R. Alternative lengthening of telomeres: Models, mechanisms and implications. **Nat. Rev. Genet.** v. 11, p. 319-330, 2010. DOI: 10.1038/nrg2763.

CHOI, ByungJoon. Influence of the hTERT rs2736100 polymorphism on telomere length in gastric cancer. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 21, n. 31, p.9328-9337, 2015.

DAYYANI, Farshid et al. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head & neck oncology**, v. 2, n. 1, p. 15, 2010.

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.

ELMORE, Lynne W; HOLT, Shawn e. Telomerase inhibition as an adjuvant anticancer therapy: it is more than just a waiting game. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.427-430, 20 mar. 2007

FATEMI, A.; SAFAI, 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- κ B pathway. **Tumor Biology**, 2015. DOI: 10.1007/s13277-015-3575-z

França, Natália Reginede, et al. "Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas." *Revista Brasileira de Reumatologia* (2010).

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.

GALVAO, Joana et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2014.

GURUNG, R. L.; LIM, H. K.; VENKATESAN, S.; LEE, P. S. W.; HANDE, M. P. Targeting DNA-PKcs and telomerase in brain tumour cells. **Molecular cancer**, v. 13, n. 232, p. 1-14, 2014. DOI: 10.1186/1476-4598-13-232.

GURUNG, Resham Lal et al. MST-312 Alters Telomere Dynamics, Gene Expression Profiles and Growth in Human Breast Cancer Cells. **Journal Of Nutrigenetics And Nutrigenomics**, [s.l.], v. 7, n. 4-6, p.283-298, 27 maio 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 4, p. 646-674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013

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

HU, Jian et al. Antitelomerase Therapy Provokes ALT and Mitochondrial Adaptive Mechanisms in Cancer. **Cell**, [s.l.], v. 148, n. 4, p.651-663, fev. 2012.

INCA, **Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva**, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2016.

KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. Ed. Manole, 1ª Ed p. 512-513, São Paulo, 2005.

LIU, Ai-qun et al. Silencing of the hTERT Gene by shRNA Inhibits Colon Cancer SW480 Cell Growth In Vitro and In Vivo. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.107-119, 10 set. 2014.

MIAO, Guo-ying et al. Telomere-Mitochondrion Links Contribute to Induction of Senescence in MCF-7 Cells after Carbon-Ion Irradiation. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.1993-1998, 1 jun. 2016.

MORAIS, Karollyne S. et al. Long-term exposure to MST-312 leads to telomerase reverse transcriptase overexpression in MCF-7 breast cancer cells. **Anti-cancer Drugs**, [s.l.], p.1-7, maio 2017.

MORAIS, Selene M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Braz J Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

OMS, **Organização Mundial da Saúde**. Acessado em 15 de março de 2017. <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index3.html>.

RAHBARI, Raheleh et al. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. **Europe Pmc Funders Group Author Manuscript**, Leicester, v. 4, n. 46, p.277-284, abr. 2009.

SALAZAR, Nicole et al. Use of shRNA for Stable Suppression of Chemokine Receptor Expression and Function in Human Cancer Cell Lines. **Cytokine Bioassays**, [s.l.], p.209-218, 2014. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0928-5_19.

SEIMIYA, H.; OH-HARA, T.; SUZUKI, T.; NAASANI, I.; SHIMAZAKI, T.; TSUCHIYA, K.; TSURUO, T. Telomere shortening and growth inhibitions of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-199. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 657-665, 2002.

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

SERRANO, D.; BLEAU, A. M.; GARCIA, I. F.; MARCELO, T. F.; INIESTA, P.; SOLORZANO, O.; et al. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde

dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. **Molecular cancer**, v. 10, n. 96, p. 1-15, 2011. DOI: 10.1186/1476-4598-10-96 63

SU, Dongyue; LIU, Yang; SONG, Tao. Knockdown of IQGAP1 inhibits proliferation and epithelial–mesenchymal transition by Wnt/ β -catenin pathway in thyroid cancer. **OncotargetsAndTherapy**, [s.l.], v. 10, p.1549-1559, mar. 2017.

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.

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.

WANG, Wenjing et al. Evaluation of intracellular telomerase activity through cascade DNA logic gates. **Chem. Sci.**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.174-180, 2017.

WEI, Chen et al. Alternative lengthening of telomeres in hTERT-inhibited laryngeal cancer cells. **Cancer Science**, v. 101, n. 8, p.1769-1776, out. 2010.