

PRINCIPAIS RESULTADOS SOBRE TERAPIAS ANTI-TUMORAIS

OLIVEIRA, E.C

Fatec Sorocaba - Coordenadoria de Sistemas Biomédicos

e-mail elaine.oliveira10@fatec.so.gov.br

Main results on anti-tumor therapies

Eixo Tecnológico: Ambiente e Saúde

Resumo

A busca por novos tratamentos para o câncer tem suscitado diferentes pesquisas nas áreas médicas e tecnológicas. O primeiro trabalho é sobre a aplicação do Plasma em Pressão Atmosférica (PPA) sobre soluções fisiológicas (NaCl e Ringer Lactato) para o tratamento de melanoma cutâneo. As soluções foram tratadas com o PPA por diferentes tempos (30, 45 e 60 minutos) e aplicadas sobre células de melanoma murino (B16F10) e o fibroblasto murino (L929) foram incubados com as soluções tratadas. Estas soluções foram congeladas em freezer -20°C para posterior avaliação da sua atividade. Os resultados mostraram que os líquidos tratados diminuem a viabilidade das células B16F10 quando comparado com a linhagem controle L929. O segundo estudo foi sobre os efeitos do Dimetil Fumarato (DMF) e Monometil Fumarato (MMF) sobre o glioblastoma multiforme (GBM). Os resultados mostraram que a concentração de MMF 10 e 20µg/mL estimula o crescimento da linhagem de glioblastoma NG-97 in vitro. O tratamento com inibidores de dois fatores de transcrição envolvidos na progressão do GBM, o STAT3 e mTOR foram capazes de reverter os efeitos estimuladores do MMF sobre a migração celular. A citometria de fluxo das NG-97 tratadas com MMF e inibidores apresentaram maior expressão de moléculas de superfície como PDL-2 e TRAIL-R3. Houve aumento da citocina TGF-β1 e não de IL-10 in vitro. No terceiro estudo avaliamos o efeito citotóxico do antineoplásico Doxorubicina (Dox) sobre esferóides de MCF-7 que foram incubados com os látex de avelós e janaúba natural e filtrados previamente. Os resultados mostraram que os látex aumentam a capacidade de invasão de esferóides de MCF-7 in vitro. O tratamento com os látex retardou a internalização da Dox, e não teve efeito citotóxicos sobre esferóide incubados com avelós e janaúba.

Palavras-chave: *Terapia antitumoral, medicamentos, resposta imune.*

Abstract

The search for new cancer treatments has sparked different research in the medical and technological areas. The first work is on applying Atmospheric Pressure Plasma (PPA) over physiological solutions (NaCl and Ringer's Lactate) to treat cutaneous melanoma. The solutions were treated with PPA for different times (30, 45, and 60 minutes) and applied to murine melanoma cells (B16F10), and murine fibroblasts (L929) were incubated with the treated solutions. For subsequent activity evaluation, these solutions were frozen in a -20°C freezer. The results showed that the treated liquids decreased the viability of B16F10 cells compared to the L929 control line. The second study was on the effects of Dimethyl Fumarate (DMF) and Monomethyl Fumarate (MMF) on glioblastoma multiforme (GBM). The results showed that the concentration of MMF 10 and 20µg/mL stimulates the growth of the NG-97 glioblastoma line in vitro. Treatment with inhibitors of two transcription factors involved in GBM progression, STAT3, and mTOR, were able to reverse the stimulatory effects of MMF on cell migration. Flow cytometry of NG-97 treated with MMF and inhibitors showed greater expression of surface molecules such as PDL-2 and TRAIL-R3. There was an increase in the cytokine TGF-β1 and not IL-10 in vitro. In the third study, we evaluated the cytotoxic effect of the antineoplastic Doxorubicin (Dox) on MCF-7 spheroids that were incubated with hazelnut and natural janaúba latex and previously filtered. The results showed that latexes increase the invasiveness of MCF-7 spheroids in vitro. Treatment with latex delayed the internalization of Dox and had no cytotoxic effect on spheroids incubated with natural and filtered avelós and janaúba.

Key-words: *Cancer therapy, Drugs, Imune response*

1. Introdução

Proposta 1

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

O câncer é um relevante problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a segunda principal causa de mortalidade entre as doenças não transmissíveis, além de ser responsável por 9,3 milhões de mortes a nível mundial [1]. O crescente número de estudos envolvendo a produção de plasma em pressão atmosférica (PPA), demonstra a importância desta técnica para aplicação em diferentes áreas da ciência, inclusive naquelas relacionadas a área médica [2]. Os principais estudos focaram no tratamento de feridas, eczemas, escaras e do câncer de pele (melanoma). O PPA é um estado físico ionizado altamente reativo que contém uma mistura de agentes físicos e quimicamente ativos. A literatura recente apresenta estudos animadores sobre a aplicação direta do PPA em tumores superficiais ou pelo tratamento destes tumores com soluções fisiológicas expostas ao plasma (aplicação indireta). Dentre os componentes gerados neste tipo de plasma estão uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) formadas pela reação com moléculas presentes no ar que entram em contato com o plasma, como o oxigênio, nitrogênio e água [3;4]. Iniciamos este estudo avaliando o efeito do soro fisiológico e o ringer lactato expostos ao PPA por 30, 45 e 60 minutos sobre a linhagem tumoral de melanoma murino (B16F10).

Nos últimos anos, evidências científicas mostraram que o plasma em pressão atmosférica (PPA) pode ser uma modalidade promissora na terapia de câncer que podem ser tratados superficialmente [5]. Neste estudo, objetivamos avaliar o efeito do PPA gerado por um jato de gás argônio sobre líquidos e avaliar sua ação sobre a linhagem de câncer murino B16F10 utilizando cultivo celular em duas dimensões (2D) e cultivo tridimensional (3D) em comparação com as células de fibroblasto não malignas L929.

Proposta 2

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral primário mais comum e agressivo dentre as neoplasias. Este tipo de tumor é classificado como glioma de grau IV, cuja sobrevivência é de três a cinco anos após o diagnóstico, a prevalência é de cerca 2,2% pacientes apenas. Existe uma incessante busca por novas drogas anticâncer, contudo a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos podem apresentar inúmeros desafios até que a droga possa ser aprovada no mercado. O reaproveitamento de medicamentos já aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) torna-se uma solução viável para essa problematização. Entre esses medicamentos que apresentam grande potencial anticancerígeno, está o Dimethyl fumarato (DMF), um éster de ácido fumárico (FAE) aprovado para o tratamento de psoríase e esclerose múltipla (EM) [6;7]. Estudos mostraram que o DMF possui efeitos farmacológicos antioxidante e anticancerígenos, além de diversas ações biológicas como moduladora das funções imunes. A droga quando ingerida é rapidamente metabolizada para a sua forma biológica ativa, o monomethyl fumarato (MMF). Devido a característica heterogênea do GBM, se faz necessário estudos sobre os efeitos deste medicamento frente o glioblastoma [8;9].

Proposta 3

Estudos já realizados pelo grupo de pesquisa da Fatec Sorocaba mostraram que os látex de avelós e janaúba em diferentes concentrações estimulam o crescimento da linhagem de câncer de mama MCF-7 utilizando a cultura em duas dimensões (2D). O objetivo deste estudo foi avaliar estes efeitos utilizando cultura de MCF-7 em três dimensões (3D), pela produção de esferóides, técnica que tem sido amplamente utilizado com o objetivo de mimetizar tumores in vitro. O câncer de mama (CM) é a principal causa de morte em mulheres em todo mundo. Baseado em evidências moleculares e histológicas, o CM pode ser categorizado em três grupos, segundo a sua imunofenotipagem: os que expressam receptor para estrógeno (RE+) ou progesterona (RP+), que expressam o receptor epidermal humano 2 (HER2+) e o CM triplo negativo (CMTN- RE-, RP-, HER2-) [10; 11]. O risco da utilização de garrafadas para o

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

tratamento de cancer ainda é minimizado por se tratar de um produto natural [12]. No entanto, os pacientes desconhecem a capacidade das células tumorais serem ativadas pelos inúmeros compostos químicos que compõe os extratos de plantas.

Devido a classificação dos CMs, terapias combinadas são utilizadas como estratégias para a contenção e indução de morte celular, com o principal objetivo de evitar metástases, que diminuem a expectativa de vida dos pacientes. Quando testamos o antineoplásico Doxorrubicina (Dox) na cultura 2D, observamos que parte das células não eram afetadas pelo medicamento se entrassem em contato previamente com os látex,. Sendo assim, a continuidade deste estudo visou avaliar este efeito sobre esferóides de MCF-7 (cultura 3D)

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Devido a metodologia utilizada para o desenvolvimento de cada projeto ser extensa, utilizamos o software online Biorender com o objetivo de demonstrar esquematicamente o delineamento experimental dos Projetos 1, 2 e 3.

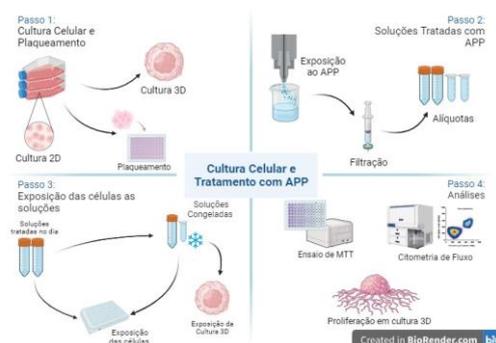
2.2. Metodologia

Projeto 1

1. Linhagens celulares. As linhagens de melanoma murinho B16F10 e o Fibroblasto murino L929 (não tumoral) foram mantidas em garrafas de cultura de 25 e 75 cm² (Corning- USA) até atingir confluência de 80%. O meio de cultivo utilizado para a manutenção das linhagens foi o DMEN (Vitrocell- Brasil), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico e 2% de glutamina (meio completo). As garrafas permaneceram em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C.

2. Tratamento de líquidos com Plasma em Pressão atmosférica. O aparelho de plasma utilizado neste estudo é o Jet kINPen IND (Neoplas Tools, Greifswald, Germany). A solução fisiológica 0,9% e a solução de ringuer lactato foram expostas ao plasma por segundos 30, 45 e 60 minutos. O desenho esquemático (Figura 1), resume os experimentos que foram realizados para a obtenção de resultados para os objetivos propostos.

Fig. 1. Desenho experimental sobre os ensaios realizados com soluções de NaCl 0,9% e do Ringer lactato ao APP e o tratamento da B16F10 e da L929 (controle) *in vitro*.



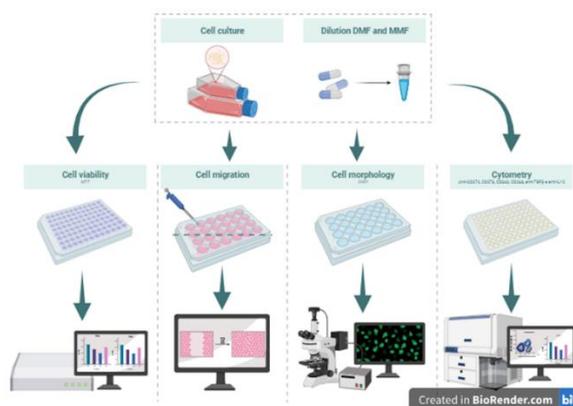
Fonte: Diego V. Neves, 2023

Projeto 2

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

1. Linhagens celulares. As linhagens de glioblastoma humano (NG-97) e o Fibroblasto murino (L929) (não tumoral) foram mantidas em garrafas de cultura de 25 e 75 cm² (Corning-USA) até atingir confluência de 80%. O meio de cultivo utilizado para a manutenção das linhagens foi o DMEN (Vitrocell- Brasil), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico e 2% de glutamina (meio completo). As garrafas permaneceram em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C.

Fig. 2. Desenho experimental sobre os ensaios realizados com o DMF e MMF sobre as linhagens de NG-97 e a L929 (controle) *in vitro*.



Fonte: Daiane M. Lima, 2023

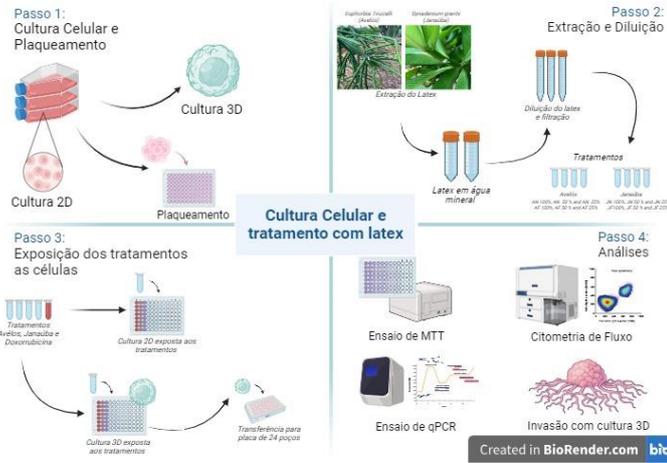
Projeto 3

1. Linhagens celulares. A linhagem de carcinoma mamário humano (MCF-7) foi mantida em garrafas de cultura de 25 e 75 cm² (Corning- USA) até atingir confluência de 80%. O meio de cultivo utilizado para a manutenção das linhagens foi o DMEM (Vitrocell- Brasil), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico e 2% de glutamina (meio completo). As garrafas permaneceram em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C.

2. Formação dos esferoides (cultura 3D). Para a formação dos esferoides será necessário utilizar placas de cultura de 96 poços estéreis com fundo em U e solução de metilcelulose (MTC) (Sigma-Aldrich- USA) na concentração de 5%, protocolo adaptado da Plataforma de Protocolos Internacionais – Jove. O meio para esferóides será preparado adicionando o MTC ao meio DMEM completo na proporção de 1:4 (1mL do MTC e 4mL de meio completo), filtrar com auxílio de uma seringa em filtro 0,22µm. A células da linhagem B16F10 e L929 na concentração de 1x10⁴ células serão diluídas em 100 µL de meio para esferóides, as células com o meio serão depositados em placas de fundo em U. Este protocolo já está estabelecido em nosso grupo, como demonstra a figura 3. Os esferóides serão utilizados após 4 dias.

Fig. 3. Desenho experimental sobre os ensaios realizados com o avelós e janaúba natural e filtrado sobre a linhagem de MCF-7 utilizando a cultura 2D e 3D.

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJI

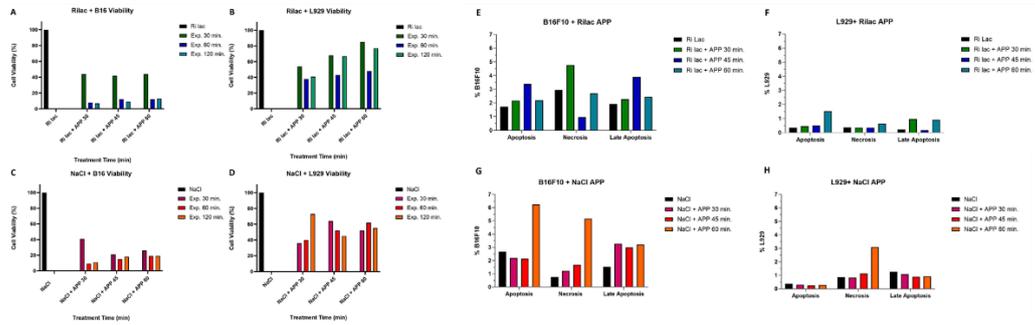


Fonte: Elaboração própria

3. Resultados e Discussão

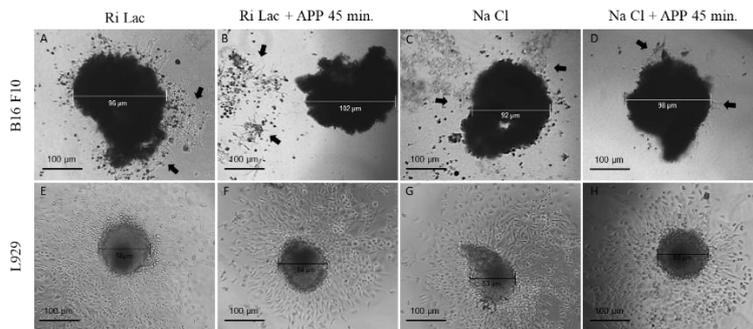
Projeto 1

Fig. 4. (A-B) Viabilidade celular por MTT das células B16F10 e L929 (C-D) expostas ao NaCl e ao Ringer lactato tratados ou não com o APP por diferentes períodos de tempo. (E-F) Avaliação do tipo de morte celular por apoptose (Anexina V) ou necrose (Iodeto de propídio) nas células B16F10 tratadas com as soluções nas mesmas condições. (G-H) A L929 foi utilizada como controle. O tempo de 45 minutos de tratamento apresentou melhor respostas em diminuir a viabilidade das células tumorais e induzir a morte celular.



Fonte: Diego V. Neves, 2023

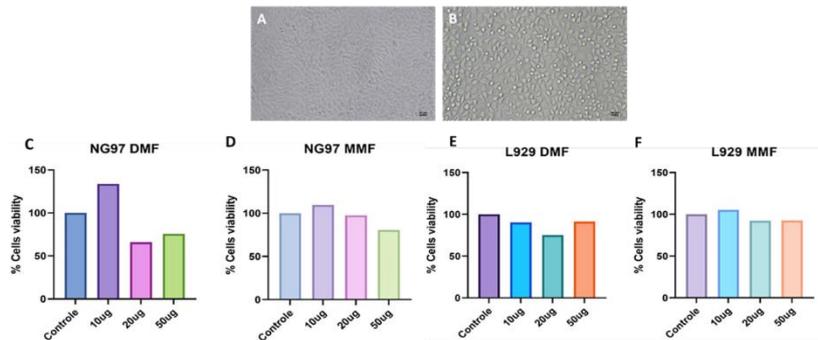
Fig. 5. Esferóides de B16F10 e L929 expostos NaCl e ao Ringer lactate no tempo de 45 minutos de exposição ao APP. Os esferóides de B16F10 diminuíram de tamanho quando comparado ao esferóide controle não tratado. Os esferóides de L929 apresentaram crescimento normal quando incubadas com as soluções tratadas ou não com o APP.



Fonte: Diego V. Neves, 2023

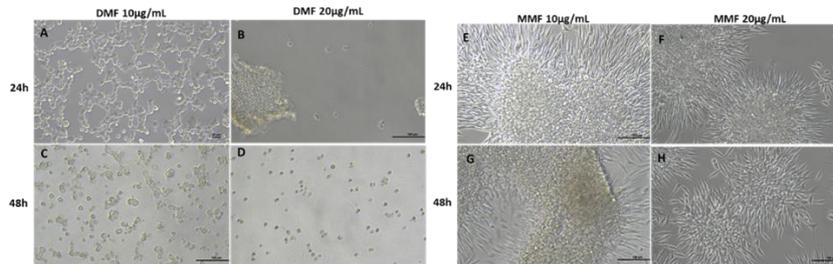
Projeto2

Fig. 6A. Efeito do DMF e MMF nas concentrações de 10 e 20µg/mL sobre a linhagem de glioblastoma humano NG97 e o fibroblasto murino L929. Morfologia das linhagens celulares utilizadas neste estudo em cultura (A) NG-97 e L929 (B). Viabilidade celular realizada pelo método do MTT das NG-97 expostas as concentrações de DMF, MMF e Controle sem tratamento (C e D). A linhagem L929 foi utilizada como célula controle experimental para os mesmos tratamentos (E e F).



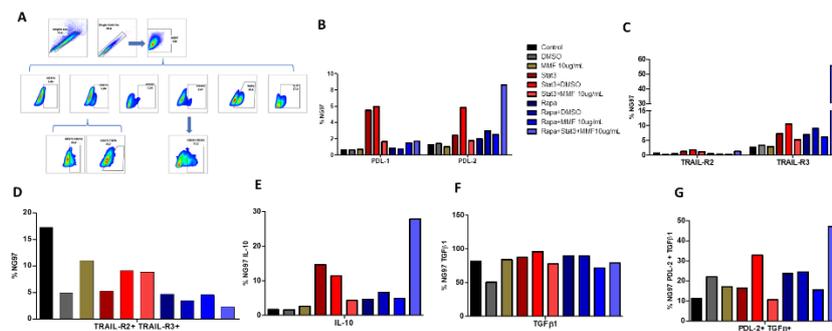
Fonte: Daiane M. Lima, 2023

Fig. 6B. Análise morfológica da linhagem de glioblastoma humano NG-97 tratadas com DMF e MMF nas concentrações de 10 e 20µg/mL no período de 24h e 48h. As fotos foram obtidas no microscópio Olympus BX50 (Tokyo, Japan) na objetiva de 20x.



Fonte: Daiane M. Lima, 2023

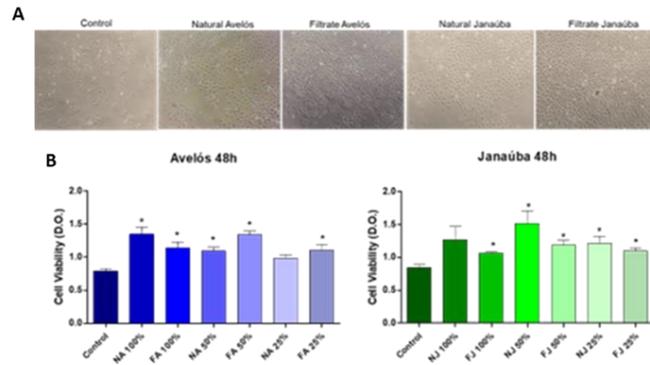
Fig. 7 (A) Estratégia de gates para análise de marcadores de superfície e intracitoplasmáticos na linhagem NG-97 tratadas com MMF 20µg/mL e inibidores. Os resultados são apresentados em porcentagem de expressão/célula. Os marcadores de superfície analisados nas células NG-97 foram anti- CD274 BUV496 (PDL-1), anti-CD273 BUV615 (PDL-2), anti-CD262 BUV395 (TRAIL-R2), anti-CD263 BUV711 (TRAIL-R3), os intracitoplasmáticos foram o anti-TGFβ BV421 e anti-L10 BV786. O software utilizado para análise dos dados foi o FlowJo. **(B, C, D, E, F e G)** Citometria de fluxo de moléculas de superfície e intracelular da NG-97 tratadas com MMF e inibidores.



Fonte: Daiane M. Lima, 2023

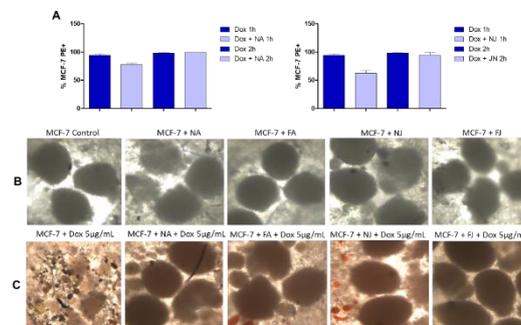
Projeto 3

Fig. 8. (A) Efeito dos látex de avelós e janaúba natural e filtrada estimulam o crescimento da linhagem de MCF-7 na cultura 2D. (B) Aumento do crescimento celular das MCF-7 estimulada com os látex por 48 horas, pelo método do MTT.



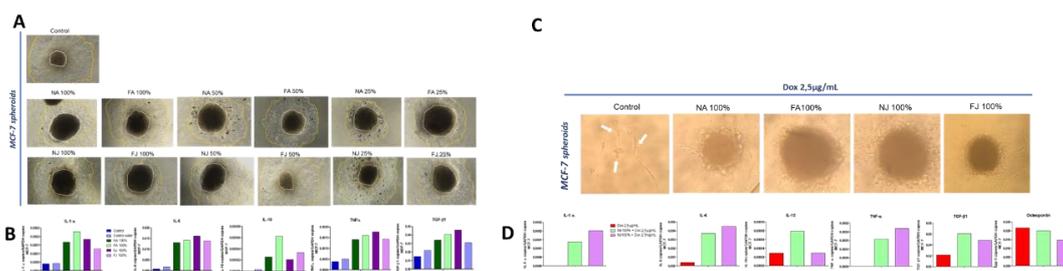
Fonte: Elaboração própria

Fig. 9. (A) Citometria de fluxo para avaliar a internalização de Doxorrubicina (Dox) pelas células MCF-7 incubadas com os látex de avelós e janaúba natural e filtrada por 24h. (B) Esferóides de MCF-7 (cultura 3D) mantem sua estrutura após serem incubados com os látex de avelós e janaúba natural e filtrada por 24h. (C) Diminuição do efeito da Dox 5µg/mL sobre os esferóides de MCF-7 incubados com os látex de avelós e janaúba natural e filtrada por 24h.



Fonte: Elaboração própria

Fig. 10. (A) Ensaio de capacidade de invasão de esferóides de MCF-7 incubados com os látex natural e filtrado. O círculo branco identifica o tumor primário, enquanto a linha amarela demonstra o quanto o tumor se expandiu a partir deste. (C) Avaliação da sobrevivência celular dos esferóides que foram transferidos para placa aderente após serem incubadas com os látex por 24h e depois tratadas com Doxorrubicina (Dox). Esferóides incubados com os látex proliferam apesar da Dox, quando comparado ao controle. (B-D) Aumento na expressão de genes para citocinas inflamatórias IL-1 α , IL-6, TNF α e anti-inflammatories IL-10 e TGF β .



Fonte: Elaboração própria

4. Considerações finais

Os objetivos propostos estão sendo alcançados em cada projeto, as repetições necessárias para as avaliações estatísticas estão sendo realizadas.

Agradecimentos

Agradecimento a FAPESP Projeto Temático 2014/26431-0 (Unicamp) e Projeto Fapesp 2020/06448-7 (Unesp Sorocaba)

Referências

- [1] BAYABLE, A. et al. Delay in health-seeking behaviour and associated factors among adult patients with cancer in Ethiopia: a multicentre cross-sectional study. **BMJ Open**, v. 13, n. 8, p. e071406, 1 ago. 2023.
- [2] MOTALN H, RECEK N, ROGELJ B. Intracellular Responses Triggered by Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Media in Cancer Cells. **Molecules**. 2021 Mar 2;26(5):1336.
- [3] YAN D, SHERMAN JH, KEIDAR M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. **Oncotarget**. 2017 Feb 28;8(9):15977-15995.
- [4] HARALAMBIEV L et al., The Effect of Cold Atmospheric Plasma on the Membrane Permeability of Human Osteosarcoma Cells. **Anticancer Res**. 2020 Feb;40(2):841-846.
- [5] ALIMOHAMMADI M et al., Cold Atmospheric Plasma Is a Potent Tool to Improve Chemotherapy in Melanoma In Vitro and In Vivo. **Biomolecules**. 2020 Jul 8;10(7):1011.
- [6] CHEN, K. et al. Dimethyl Fumarate Induces Metabolic Crisis to Suppress Pancreatic Carcinoma. **Front Pharmacol**. 2021 Feb 22;12:617714.
- [7] ZHANG Z et al., Brain-restricted mTOR inhibition with binary pharmacology. **Nature**. 2022 Sep;609(7928):822-828.
- [8] AHMADI-BENI, R. et al. Role of dimethyl fumarate in the treatment of glioblastoma multiforme: A review article. **Iran J Neurol**.18(3):127-133, 2019.
- [9] SHAFER D, Tombes MB, Shrader E, Ryan A, Bandyopadhyay D, Dent P, Malkin M. Phase I trial of dimethyl fumarate, temozolomide, and radiation therapy in glioblastoma. **Neurooncol Adv**. 2020 Jan 24;2(1):vdz052.
- [10] BARZAMAN K et al., Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **Int Immunopharmacol**. 2020 Jul; 84:106535.
- [11] FINKELMAN BS, ZHANG H, HICKS DG, TURNER BM. The Evolution of Ki-67 and Breast Carcinoma: Past Observations, Present Directions, and Future Considerations. **Cancers** (Basel). 2023 Jan 28;15(3):808.
- [12] CHOENE M, MOTADI L. Validation of the Antiproliferative Effects of Euphorbia tirucalli Extracts in Breast Cancer Cell Lines. **Mol Biol** (Mosk). 2016 Jan-Feb;50(1):115-27.