

KAROLLYNE DA SILVA MORAIS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO *IN VITRO* DE INIBIDOR DE
TELOMERASE MST-312 EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA.

BRASÍLIA, 2016.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KAROLLYNE DA SILVA MORAIS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO *IN VITRO* DE INIBIDOR DE
TELOMERASE MST-312 EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA.

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de
Oliveira

Co-Orientador: Prof.^a Dr.^a. Doralina do Amaral
Rabello Ramos

BRASÍLIA

2016

KAROLLYNE DA SILVA MORAIS

MESTRE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 17 de junho de 2016.

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira – presidente
Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Eliete Neves da Silva Guerra – membro
Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Andrea Barreto Motoyama – membro
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann – suplente
Universidade de Brasília

*Aos meus filhos,
minha eterna motivação.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, quem me manteve firme diante de todas as adversidades. Foi meu colo protetor e refúgio diário.

Ao meu consorte, pela compreensão e apoio durante toda a minha jornada acadêmica. À minha mãe, pelo seu altruísmo, por ser a mãe dos meus filhos, em todos os momentos em que eu me ausentei por conta do mestrado.

Ao meu orientador Professor Diêgo, pela paciência e pelo tempo investido, para que eu me tornasse, não somente uma boa profissional, mas também uma pessoa melhor. Obrigada pela confiança e crédito, mesmo conhecendo as minhas limitações.

À minha co-orientadora Professora Dora, pela disponibilidade, paciência, atenção em cada detalhe e convivência produtiva.

A todos do laboratório e participantes do projeto, com quem tive a sorte de aprender e compartilhar tempo e conhecimento.

Aos órgãos que permitiram esse trabalho, Capes, FAPDF e CNPQ.

Que a obrigação de produzir não aliene a arte de criar.

(Autor desconhecido)

RESUMO

As células normais tem potencial proliferativo regulado, e na maioria dos tipos celulares, obedecem a um número determinado de ciclos. Para que uma célula possa proliferar indefinidamente e de forma autônoma e ser considerada uma célula de câncer, ela deve passar pelo processo de imortalização. Os telômeros estão intimamente relacionados com o processo de imortalização, pois encurtam a cada ciclo celular, limitando a capacidade proliferativa. A telomerase é uma enzima que restaura a integridade dos telômeros, e está presente em 85% dos tipos de câncer, o que a torna um potencial alvo terapêutico. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente em todo o mundo, e entre as mulheres é o primeiro em mortalidade. Dada a sua importância epidemiológica, foram utilizadas neste estudo linhagens de câncer de mama que expressam telomerase, MCF-7 e MDA-MB-231, submetidas a tratamentos de curto e longo prazo com o inibidor de telomerase MST-312. Este foi citotóxico para ambas as linhagens em tratamentos de curto prazo, com morte celular acentuada nas doses de 5 μ M em MCF-7 e 10 μ M em MDA-MB-231, efeito este que independe da crise telomérica. Após 18 semanas de tratamento em dose subtóxica do MST-312, as linhagens foram novamente submetidas aos ensaios de citotoxicidade. A linhagem de MCF-7 apresentou maior sensibilidade ao MST-312 após o tratamento de longo prazo, com sinais de senescência celular acentuadas nos grupos tratados com o inibidor e cariótipos característicos de crise telomérica. Enquanto que a linhagem MDA-MB-231 demonstrou sinais de aquisição de resistência à droga, não demonstrando senescência celular, e maior viabilidade celular no grupo tratado com MST-312 por 18 semanas, quando comparado com o grupo controle. Demonstrando que células que expressam telomerase respondem de maneira diferente ao mesmo inibidor.

Palavras-chave: Câncer de mama; Telômero; Telomerase; Inibidor de telomerase; MST-312.

ABSTRACT

Normal cells show a limited potential proliferative, presenting a reduced number of cell cycles. For one cell to be able to proliferate indefinitely and it becomes a tumoral cell, it needs to suffer an immortalization process. The telomeres are closely relating to the immortalization cell process, once that to each cell cycle they are facing a shortening which limits the proliferative capacity of them. Additionally, the telomerase enzyme, the protein that plays an importante role in to restore the telomere integrity and is present in about 85% of câncer types, it became a potential therapeutic target. The breast câncer is the second câncer type with the major incidence in the world and the first cause of mortality by tumor among women. Due its epidemiologic importance, in this study were used two cell lineages of breast câncer which express the telomerase enzyme, MCF-7 and MDA-MB-231, which they were submitted to treatments of long and short duration with the telomerase inhibitor MST-312. Both cell lineages utilized in this work showed citotoxicity in the treatments of short duration, with accentuated death cell in response to 5 μM dose of MST-312 in MCF-7 and 10 μM dose in the MDA-MB-231, this effect probably is independent of telomeric shortening. After 18 weeks of treatment using sub-toxic doses of the MST-312 inhibitor, the cell lineages were submitted to citotoxicity essays. The MCF-7 lineage presented a sensibility more elevated during the treatment of long duration showing cell senescence signals more accentuated in the group treated with the inhibitor and with intrinsic karyotypes of telomeric crisis. As results, the cell lineage MDA-MB-231 demonstrated signals of resistance acquisition to drug employed in this work, without signals of cell senescece, and in the citotoxicity essay under 10 μM dose, it was showed a significative cell number of inviable cells in the control group in comparing to the group treated for 18 weeks with MST-312 inhibitor. These results demonstrate that cells which are able to express the telomerase enzyme can respond of different ways to the same inhibitor.

Keywords: breast cancer; telomere; telomerase; Telomerase inhibitor; MST-312.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Características essenciais das células de câncer.....	12
Figura 2. Localização do telômero no cromossomo e sua estrutura	15
Figura 3. O “problema da replicação” e o encurtamento dos cromossomos a cada ciclo celular	16
Figura 4. Desenho esquemático da telomerase	17
Figura 5. Estrutura química do MST-312, de acordo com o fabricante	18
Figura 6. Diagrama experimental do estudo	25
Figura 7. Expressão de <i>hTERT</i> das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7	31
Figura 8. Tamanho médio dos telômeros em escala logarítmica	31
Figura 9. Citotoxicidade do tratamento de curto prazo em MCF-7 e MDA-MB-231	33
Figura 10. Viabilidade celular dos controles de MCF-7 e MDA-MB- 231 nos tratamentos de curto prazo.....	33
Figura 11. Dados de IC _{50%} de MCF-7 e MDAMB-231	34
Figura 12. Comportamento proliferativo da linhagem MDA-MB-231 no tratamento de longo prazo	35
Figura 13. Citotoxicidade do MST-312 na linhagem MDA-MB-231 após exposição de 18 semanas	36
Figura 14. Viabilidade celular dos controles de MDA-MB- 231 nos tratamentos de longo prazo	36
Figura 15. Curvas dose-resposta de MST-312 para células MDA-MB-231 após 72 horas de tratamento	37
Figura 16. Micrografia das células MDA-MB-231 demonstrando a sua confluência nos tratamentos de DMSO 0,1% E MST-312 [10µM]	38
Figura 17. Porcentagem de células MDA-MB-231 viáveis na concentração de 10 µM	39
Figura 18. Micrografias de cariótipos de células MDA-MB-231	39
Figura 19. Tamanho médio dos telômeros dos grupos M e D de MDA-MB-231	40
Figura 20. Comportamento proliferativo da linhagem MCF-7 no tratamento de longo prazo	41

Figura 21. Citotoxicidade do MST-312 na linhagem MCF-7 após exposição de 18 semanas	41
Figura 22. Viabilidade celular dos controles de MCF-7 nos tratamentos de longo prazo	42
Figura 23. Curvas dose-resposta de MST-312 para células MCF-7 após 72 horas de tratamento	43
Figura 24. Micrografia de células MCF-7 demonstrando as suas características morfológicas nos tratamentos de DMSO 0,1% E MST-312 [1 µM]	43
Figura 25. Porcentagem de células viáveis na concentração de 1 µM	44
Figura 26. Micrografia e gráfico das células MCF-7 nos ensaios de senescência celular	44
Figura 27. Micrografia de cariótipos de MCF-7 após 18 semanas de tratamento...	45
Figura 28. Expressão de <i>hTERT</i> em células MCF7 dos Grupos D e M	45
Figura 29. Tamanho médio dos telômeros dos grupos M e D de MCF-7	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as características das células estudadas	19
Tabela 2 – Fatores de risco mais significativos para o câncer de mama segundo a Organização Mundial da Saúde. Comparação entre homens e mulheres	20
Tabela 3 – Sequências de iniciadores e nucleotídeos utilizadas no ensaio de Tamanho Relativo de Telômeros	29
Tabela 4 - Comparação do tempo de duplicação das linhagens utilizadas	32
Tabela 5 - Caracterização das linhagens com os dados de expressão de <i>hTERT</i> ; Comprimento médio dos telômeros e tempo de duplicação (comparação entre as linhagens)	32
Tabela 6 - Comparação dos resultados das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 nos tratamentos de curto prazo	34
Tabela 7 - Comparação entre os dados obtidos Nos ensaios realizados com as linhagens estudadas	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
cDNA	DNA complementar às sequências de RNA mensageiro
CO ₂	Dióxido de carbono
DKC1	Complexo disquerina da telomerase
DEMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotideo de DNA
GAPDH	Enzima multifuncional Gliceraldehido-3-fosfato desidrogenase
hTERT	Subunidade catalítica da telomerase
hTR	RNA molde da Telomerase
IC _{50%}	Concentração inibitória para 50% das células
mA	Miliampere
MCF-7	Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB-231	Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MST-312	Inibidor de telomerase sintético
MTT	Técnica colorimétrica para avaliar viabilidade
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação de polimerase em cadeia
qPCR	PCR em tempo real
R ²	Coeficiente de determinação
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase Reversa
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação de polimerase em cadeia
TaqDNA	Enzima polimerase que adiciona dNTP
TERT	Telomerase reverse transcriptase
V	Volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 BIOLOGIA DO CÂNCER	12
1.1.1 O Processo de Carcinogênese	12
1.1.2 Imortalização Celular	14
1.1.3 O Inibidor de Telomerase MST-312	18
1.2 O CÂNCER DE MAMA	19
1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	20
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVO GERAL	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 METODOLOGIA	24
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	24
4.2 SELEÇÃO DE LINHAGENS	25
4.3 CULTURA DE CÉLULAS	26
4.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DO MTT	26
4.5 DETERMINAÇÃO DE IC _{50%}	27
4.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	27
4.7 AVALIAÇÃO DE SENESCÊNCIA CELULAR	27
4.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE TELOMERASE	28
4.9 ANÁLISE DE CARIÓTIPO	28
4.10 TAMANHO RELATIVO DOS TELÔMEROS	29
4.11 TAXA DE PROLIFERAÇÃO	29
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS	31
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS	31
5.2 TRATAMENTO À CURTO PRAZO	32
5.3 TRATAMENTO À LONGO PRAZO DE MDA-MB-231	35
5.4 TRATAMENTO À LONGO PRAZO DE MCF-7	40
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÕES	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOLOGIA DO CÂNCER

1.1.1 O Processo de Carcinogênese

Câncer é o nome genérico dado ao conjunto de mais de 100 doenças diferentes, caracterizadas essencialmente pelo crescimento desordenado. Porém, é atualmente compreendido como a doença causada por tecidos complexos constituídos por vários tipos celulares distintos que interagem entre si e com as células adjacentes, e possuem características que as distinguem das células somáticas (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Essas características são basicamente capacidades adquiridas pelas células que permitem o crescimento ilimitado e invasivo, como ilustrado na Figura 1.

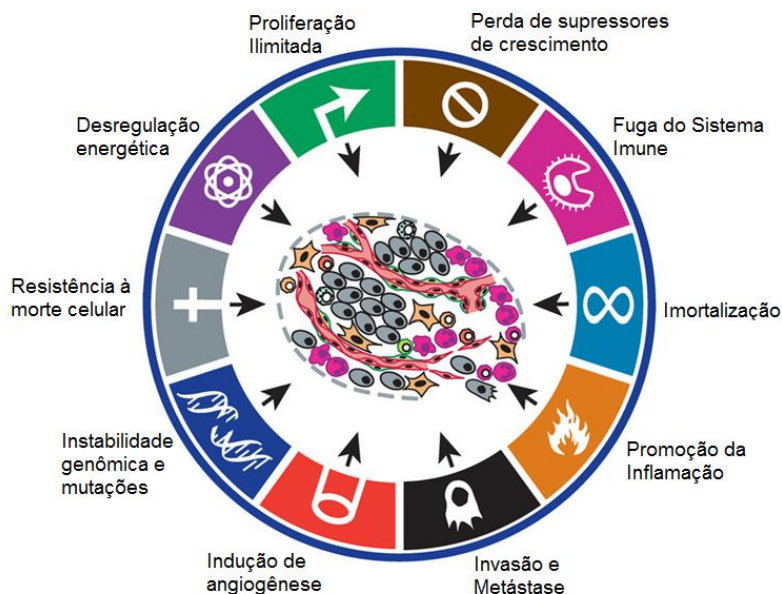


Figura 1. Características essenciais das células de câncer. (Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A proliferação descontrolada e autônoma é um dos aspectos das células de câncer que as diferem das células normais, que por sua vez possuem seu ciclo celular cuidadosamente controlado. Os caminhos pelos quais as células burlam os mecanismos de regulação estão apenas parcialmente elucidados. Modelos experimentais demonstram a importância das mutações em oncogenes e genes supressores de tumor na participação da desregulação dos *feed backs* negativos ligados à sinalização proliferativa (JLIANG e LIU, 2009). Células de câncer são geneticamente instáveis e com relevante heterogeneidade intra-tumor (GERLINGER *et al.*, 2012; BRUIN *et al.*, 2013), ou seja, células de um mesmo tumor com diferentes mutações acumuladas sucessivamente e que lhes conferem diferentes capacidades.

Em condições normais, as células não proliferam quando ocorre inibição por contato com outras células. Esse mecanismo não é válido para as células de câncer que continuam duplicando independentemente desse contato. No processo de carcinogênese, a interação entre as células pode estimular a liberação de fatores de crescimento (CHEN *et al.*, 2008) e também a superexpressão de receptores para esses fatores.

Mesmo em condições de proliferação intensa e, por consequência, mais chances de lesão ao DNA (ácido desoxirribonucleico), as células de câncer podem progressivamente inibir a apoptose. O que não ocorre em células normais. Os mecanismos de reparo do DNA podem disparar a apoptose, evitando que mutações sejam perpetuadas às células filhas, fazendo uso de um mecanismo complexo de sinalização celular que desencadeia a morte celular programada (ADAMS e CORY, 2007). Porém, células malignas têm a habilidade de manipular os mecanismos de apoptose desencadeada por múltipla sinalização (APEL *et al.*, 2009) seja pela expressão de fatores antiapoptóticos ou regulação negativa dos fatores pró-apoptóticos (ARTANDI e DEPINHO, 2010).

Mesmo estratégias fisiológicas que são efetivas, como o processo de autofagia desencadeado por genes supressores de tumor, leva a morte de células somente no início da tumorigênese (APEL *et al.*, 2009), em outras circunstâncias podem fazer inclusive com que elas fiquem quiescentes (WHITE e DIPOLA, 2009). As respostas inflamatórias que normalmente são benéficas em condições normais, neste cenário podem inclusive favorecer o tecido neoplásico, por promover a

angiogênese e liberar mais fatores de crescimento (STAMPER *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2008). Essas especificidades demonstram o quanto estes microambientes tumorais são complexos, de dinâmica única e extremamente adaptáveis às condições desfavoráveis de desenvolvimento.

1.1.2 Imortalização Celular

Células normais têm potencial proliferativo limitado, obedecendo a um número determinado de ciclos. Se, por desregulação, a célula permanecer no ciclo de divisão após atingir o limite proliferativo, em dado momento essa célula só poderá se tornar senescente ou entrar em crise. Na primeira possibilidade, ela perde a capacidade de proliferar, mas se mantém viável. Na segunda, inevitavelmente, entra em processo de morte celular. Quando uma célula transpõe esses obstáculos e adquire habilidade de proliferação ilimitada, ela se torna imortalizada.

Para que uma célula possa proliferar indefinidamente, ou seja, para que ela seja de fato uma célula neoplásica, é imprescindível que ela sofra o processo de imortalização (WEINBERG, 2008). Todo o desenvolvimento da doença perpassa por este ponto que definirá a sua sustentabilidade, e traduz a relevância de se estudar os mecanismos de imortalização celular.

Os telômeros estão intimamente relacionados com o processo de imortalização celular. São complexos nucleoprotéicos estruturados em sequências repetitivas do hexanucleotídeo 5'-TTAGGG-3', localizados na porção final dos cromossomos (Figura 2), variam de 15-20 quilo bases ricos em guaninas. (AVILION *et al.*, 1996; REDDEL, 2014, FEIJOO *et al.*, 2014; SANTAMBROGIO *et al.*, 2014).

As estruturas teloméricas têm a função primordial de proteger o material genético devido ao “problema da replicação”. Os telômeros encurtam a cada ciclo celular, limitando a capacidade proliferativa, e em condições normais podem disparar os mecanismos de senescência e apoptose, como um relógio biológico que impõe um fim à possibilidade de duplicação (WEINBERG, 2008; BAR e BLASCO, 2016).

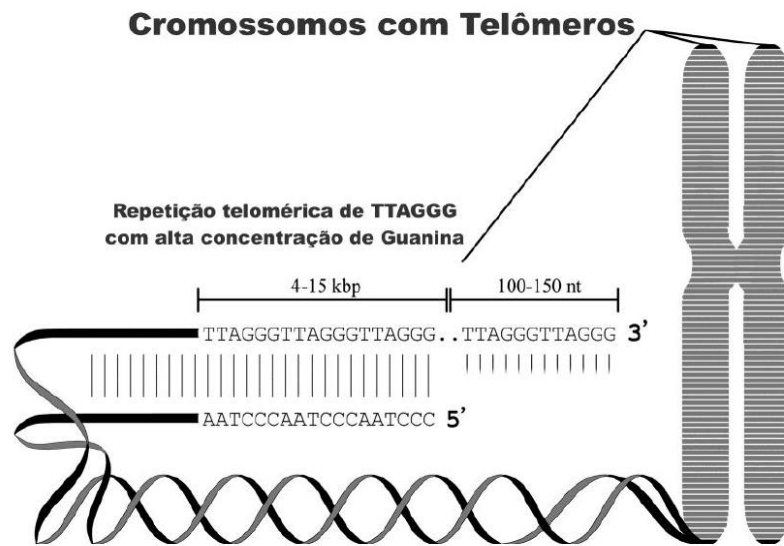


Figura 2. Localização do telômero no cromossomo e sua estrutura (Adaptado de PEREIRA Jr, 2008).

Nas porções distais do telômero (em relação ao centrômero do cromossomo) predominam a sequência clássica com raras variações de GTAGGG e TTCGGG, enquanto que nas porções proximais também podem ser encontrados em proporções menores, variações do *tandem* como TTGGGG, TGAGGG e TCAGGG (LEE *et al.*, 2013). Essas variações podem ser relevantes para a formação de estruturas G-Quadruplex que estabilizam essa região e controlam a acessibilidade de proteínas e enzimas (BURGE *et al.*, 2006; HWANG *et al.*, 2014; CREES *et al.*, 2014).

A cada replicação, a fita líder do DNA é estendida até a sua extremidade 5', entretanto na fita tardia não é possível fazer uma cópia completa sem que se tenham vários iniciadores envolvidos. Sempre permanece uma região no final do cromossomo, onde o seu iniciador estava ligado, que não pode ser sintetizada (WATSON *et al.*, 2006). Isso resulta em uma replicação incompleta de uma pequena região na extremidade 3' do DNA produzido na fita tardia como demonstrado na Figura 3.

No Telômero a extremidade 3' se estende além da extremidade 5', o que compensa essa falha na replicação que encurta a cada ciclo formando a *T-loop* (*alça*) (WATSON *et al.*, 2006). A cada replicação o telômero encurta cerca de 200 a 500 pares de bases (pb), até que seu comprimento se torne crítico e não seja possível a conformação em *T-loop* e o DNA passe a ser reconhecido pelos

mecanismos de reparo como quebra de cadeia dupla, desencadeando uma série de eventos que podem culminar com crise telomérica, surgimento de aberrações cromossômicas e a morte celular (ROMANIUK *et al.*, 2014).

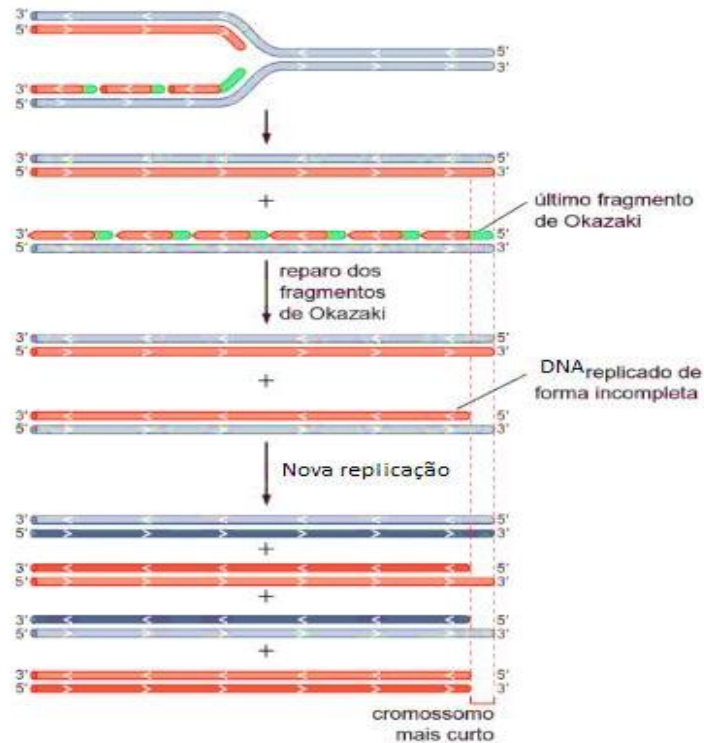


Figura 3. O “problema da replicação” e o encurtamento dos cromossomos a cada ciclo celular (Adaptado de Biologia Molecular do Gene, WATSON *et al.*, 2006).

Mais de 85% dos tumores fazem uso da via clássica de immortalização, que consiste na expressão da enzima telomerase, para manter os telômeros viáveis e a capacidade de proliferação indefinida (BRYAN *et al.*, 1995, 1997;. CESARE E REDDEL, 2010). A telomerase é uma enzima *transcriptase reversa* específica composta por um componente RNA que atua como molde (hTR), uma subunidade catalítica (hTERT), e proteínas acessórias, como apresentado na Figura 4 (WANG, *et al.*, 1998;. WYATT, WEST, BEATTIE, 2010). A hTERT é uma proteína que contém um sítio com atividade transcriptase reversa (RT) responsável pela atividade enzimática da telomerase. O seu componente de RNA, o hTR, contém o modelo de sequências (AAUCCCAAU) através da qual a telomerase pode estender as repetições teloméricas (YATABE *et al.*, 2002).

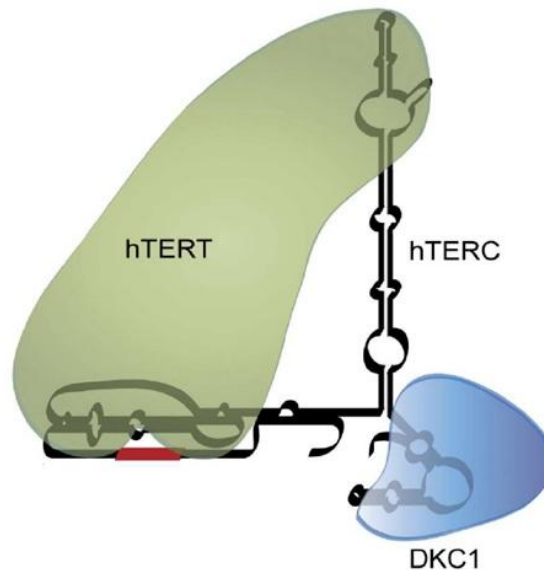


Figura 4. Desenho esquemático da telomerase. Transcriptase reversa da telomerase hTERT, em verde, Disquerina DKC1, em azul, que se ligam especificamente ao RNA hTERC, em preto, e região molde para a repetição telomérica, em vermelho (Adaptado de PEREIRA, 2008).

Essa enzima tem como principal atuação a restauração dos telômeros, porém há evidências de que, além desta função bem estabelecida, a telomerase tem muitas outras atividades que ainda não são tão bem compreendidas, como a transcrição heterocromática, regulação e silenciamento gênico (MAIDA e MASUTOMI, 2015). Estudos em ratos e células cultivadas revelaram novas funções da telomerase, em condições em que a sua atividade enzimática foi eliminada (CONG e SHAY, 2008). TERT tem a capacidade de amplificar a sinalização pela via Wnt, servindo como um co-fator do complexo de transcrição b-catenina/LEF e pode ser encontrada não somente nos telômeros, mas associada à cromatina em vários locais ao longo dos cromossomos (PARK *et al.*, 2009; MASUTOMI *et al.*, 2005).

A telomerase encontra-se muito ativa durante a embriogênese em células germinativas, porém não tem atividade expressiva nas células somáticas normais (KARP, 2005). Enquanto hTR é detectada em todas as células humanas, a expressão de hTERT é restrita a células com atividade de telomerase mensurável, representando, o fator limitante para a atividade da enzima (MEYERSON *et al.*, 1997). Fato que torna essa enzima um alvo farmacológico relevante do ponto de vista terapêutico, por estar presente na maioria das células tumorais, e ausente na grande maioria dos tecidos saudáveis.

1.1.3 O Inibidor de Telomerase MST-312

Uma das limitações terapêuticas do câncer, devido à complexidade do tecido neoplásico, é que a ação desejável de uma droga seja altamente específica para as células acometidas, amenizando seus efeitos adversos. Outro desafio é que essa mesma droga possa ser utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, favorecendo o acesso ao tratamento (LEWIN e SIU, 2015). O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas na telomerase representa uma possibilidade de melhorar a eficiência dos tratamentos em oncologia, com o auxílio de um fármaco capaz de promover o efeito desejado de forma específica, mesmo em diferentes tipos de tumores.

O MST-312 é um inibidor de telomerase sintético derivado das catequinas do chá verde (Figura 5). A utilização *in vitro* deste inibidor tem demonstrado respostas positivas por requerer concentrações mais baixas, em comparação com inibidores similares (SEIMIYA *et al.*, 2002). Apresentou também efeito inibitório da capacidade proliferativa, diminuição do comprimento dos telômeros com indução de apoptose (SERRANO *et al.*, 2011). Além da inibição aguda da telomerase e parada do ciclo celular (GURUNG *et al.*, 2014) em diferentes tipos de câncer, apontando para possíveis novas abordagens terapêuticas. Apesar disso, não existem dados recentes que demonstrem uma ação antitumoral desse composto em usos prolongados. Portanto, mais que apontar o MST-312 como protótipo de quimioterápico, um estudo nesse sentido ampliaria o conhecimento sobre as consequências moleculares da sua interferência na manutenção dos telômeros em células de câncer expostas a tratamento por longos períodos.

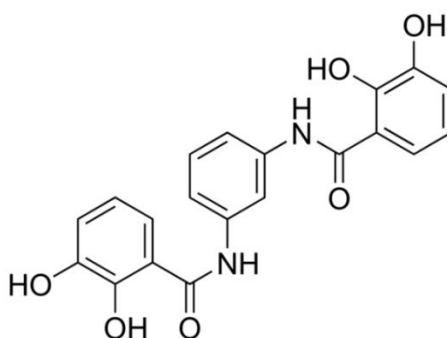


Figura 5. Estrutura química do MST-312, de acordo com o fabricante (Acessado em 05/04/2016 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3949?lang=pt®ion=BR.>).

1.2 O CÂNCER DE MAMA

A glândula mamária é composta por aproximadamente 25 lóbulos de glândulas túbulo-alveolares, separados por tecido conjuntivo denso e tecido adiposo. A estrutura histológica da glândula mamária nas mulheres varia de acordo com o estado fisiológico. Cada lóbulo é uma glândula individualizada com seu próprio ducto excretor ou ducto galactóforo. Os carcinomas comumente encontrados nos casos de câncer de mama originam-se das células epiteliais dos ductos galactóforos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os carcinomas constituem 80% de todos os tipos de neoplasias malignas. Desenvolvem-se a partir de tecidos epiteliais (WEINBERG, 2008). No presente estudo, foram utilizadas células modelo de adenocarcinoma imortalizadas, que são carcinomas originados a partir de células especializadas (que em condições normais revestem e secretam substâncias nos ductos e cavidades) (CHAVEZ, 2010).

Os diversos tipos de câncer de mama são agrupados de acordo com a histopatologia e as características clínicas, de modo a facilitar o estadiamento e a abordagem terapêutica, porém a heterogeneidade celular e molecular dos tumores de mama ainda são pouco explorados como estratégia para orientar o oncologista (CARELS *et al.*, 2016; GOBBI, 2012). Células de câncer são geneticamente instáveis e a investigação dos padrões construídos pelos genes envolvidos nas suas diversas características, podem fornecer uma base sólida para a clínica (FILHO e GATTAS, 2001). Na tabela 1 é possível comparar as características das linhagens utilizadas como modelo neste estudo.

Tabela 1 – Características das linhagens de células estudadas (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2016. Adaptado).

Característica	MCF-7	MDA-MB-231
Origem	Glândula Mamária - Derrame Pleural	Glândula Mamária Derrame Pleural
Tipo	Carcinoma Ductal Invasivo	Adenocarcinoma
Receptor de estrogênio	+	-
Rec. de progesterona	+	-
Cerb-B2	*	*
Características	Metastático Fracamente invasivo	Metastático Altamente invasivo

1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente em todo o mundo (1,7 milhão de casos), atrás somente do câncer de pulmão (1,8 milhão de casos). Entre as mulheres é o de maior ocorrência (27%) e o primeiro em mortalidade. Estima-se que somente para 2016 ocorram aproximadamente 58 mil novos casos só no Brasil, com risco estimado de 56,20 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2016). Esses dados evidenciam a relevância desta doença do ponto de vista epidemiológico e para a Saúde Pública. Com alto risco tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, as estratégias de prevenção, detecção precoce e tratamento eficiente são cruciais para que o prognóstico possa ser o melhor possível, com a redução nas taxas de mortalidade (OMS, 2016).

Caracterizada como uma doença multifatorial, o câncer de mama tem vários aspectos envolvidos, como vida reprodutiva, histórico familiar, maternidade e lactação, prática de atividade física, alimentação, consumo excessivo de álcool/cigarro (Tabela 2) e principalmente idade, reconhecidos como fatores de risco para o seu aparecimento e desenvolvimento, sendo a obesidade e o sedentarismo sérios agravantes (LACEY *et al.*, 2009; DANAEI *et al.*, 2005).

Tabela 2 – Fatores de risco mais significativos para o câncer de mama segundo a Organização Mundial da Saúde. Comparação entre homens e mulheres (Perfiles oncológicos de los países, 2014. Adaptado).

Fator de Risco	Mulheres	Homens
Consumo de Tabaco (2011)	13%	21,6%
Consumo de álcool per capita em litros (2010)	4,2	13,6
Inatividade Física (2010)	29,4%	24,9%
Obesidade (2014)	22,9%	17,2%

A idade é fator determinante (menarca precoce e menopausa) para o surgimento da doença, com incidência relevante até os 50 anos de idade e apresentação clínica distinta para pacientes jovens e de idades mais avançada (INCA, 2016).

As políticas públicas de prevenção e controle têm papel fundamental para o diagnóstico precoce da doença, e são tão urgentes quanto o investimento massivo

na pesquisa científica de novas abordagens terapêuticas. Os milhares de pacientes que sofrem de câncer representam uma sobrecarga onerosa para o sistema público de saúde, que poderia ser aliviado com tratamentos mais eficientes, acessíveis e com menos efeitos colaterais. Drogas que atuem seleta e efetivamente nas células de câncer proporcionariam aos pacientes um tratamento com mais qualidade de vida e melhor recuperação (CARELS *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma doença de impacto epidemiológico presente em todo o mundo, com expressivas taxas de morbidade e mortalidade. A abordagem terapêutica desse tipo de câncer não é simples devido à sua complexidade histopatológica e molecular. O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com base na telomerase pode ser capaz de melhorar a eficiência dos tratamentos em oncologia, em especial no câncer de mama, com o auxílio de uma droga capaz de promover o efeito desejado de forma mais específica, mesmo em diferentes tipos de tumores. Para que isso seja possível, devem ser realizados estudos sobre os inibidores de telomerase, na tentativa de demonstrar seus mecanismos de ação, sua eficiência em várias linhagens de câncer e as consequências do uso prolongado para as células.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento de longo prazo do inibidor de telomerase MST-312 em células de câncer de mama a fim de determinar seu potencial terapêutico para o tratamento dessa doença.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a $IC_{50\%}$ (concentração inibitória para 50% das células) e concentrações subtóxicas do inibidor em células tumorais telomerase positivas de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7, estabelecendo concentração adequada para o tratamento de longo prazo.

Avaliar o impacto do tratamento de longo prazo com MST-312 na viabilidade e proliferação celular nestas linhagens.

Confirmar o potencial desse composto em reduzir o tamanho médio dos telômeros nas células testadas.

Observar e comparar o comportamento de células de linhagens diferentes do mesmo tipo de câncer submetidas a condições semelhantes de tratamento com o inibidor de telomerase.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Várias linhagens foram submetidas à seleção, utilizando-se como critério de escolha a expressão de telomerase. As linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram escolhidas por serem células de câncer de mama e expressarem telomerase em níveis detectáveis pelos métodos usados, o que tornaria os resultados mais comparáveis e mais adequados aos objetivos propostos. Foi realizada a avaliação morfológica, de tamanho médio de telômero e de proliferação, antes do início do tratamento.

As células tratadas por curto prazo foram semeadas em placas de 96 poços com 6000 células por poço e tratadas por 72 horas. Após esse período foram feitas as avaliações de senescência e viabilidade.

As células tratadas por longo prazo foram submetidas à exposição ao MST-312 por mais de 60 ciclos de duplicação. No grupo controle D, as células foram tratadas com DMSO (dimetilsulfóxido) a 0,01%; e no Grupo M, foram tratadas com MST-312 [2 μ M] diluído em DMSO a 0,01% (concentração final). Quando a confluência da placa atingia entre 80 a 90% as células eram retiradas da placa de cultivo, contadas com auxílio de câmara de Neubauer e transferidas para uma nova placa, em um número total de 5000 células viáveis.

Em ambos os grupos foram contabilizados, a cada passagem, os números de células viáveis e inviáveis com uso de azul de tripan. Ao final do período de tratamento, amostras foram coletadas para os ensaios de determinação de tamanho médio dos telômeros, avaliação morfológica, teste de senescência, cariotipagem, expressão relativa do gene (*hTERT*) e nova avaliação de resposta à ação tóxica do MST-312 (Figura 6).



Figura 6. Diagrama experimental do estudo.

4.2 SELEÇÃO DE LINHAGENS

A expressão de telomerase foi verificada nas células em cultura por meio da técnica de RT-PCR semi-quantitativa, que é uma reação da transcriptase reversa seguida de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), na qual, a partir do RNA extraído, a enzima transcriptase reversa sintetiza o cDNA (DNA complementar às sequências de RNA mensageiro - mRNA). Apenas as duas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, de câncer de mama, mostraram expressão da enzima telomerase integraram o estudo.

A reação de PCR para identificação da Telomerase foi realizada com 30 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos. Em 10 µL de volume final da reação tínhamos: dNTPs (50 mM cada), usados como matéria prima para a síntese das fitas filhas, 0,3 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 iniciadores (pequenas sequências sintéticas de DNA que delimitam a sequência alvo) e 1,5mM de cloreto de magnésio, usado como cofator da Taq DNA polimerase e 2µL de amostra de cDNA. Foi utilizado gel de agarose a 2% para a realização da corrida de eletroforese a 200 mA, 200 V, por 60 minutos e assim a visualização das bandas dos produtos amplificados na PCR, *hTERT* com 252pb e *GAPDH* com 450pb. A quantificação foi realizada através de densitometria com o software ImageJ 1.50i.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS

Células de carcinoma da mama MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium - Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 100 U/ml de penicilina e estreptomicina. Todas as células foram mantidas na estufa umidificada com CO₂ a 5% e temperatura de 37° C. A solução estoque de 50 mM do composto MST-312 (Sigma) foi preparado em dimetilsulfóxido (DMSO). As células foram divididas em dois grupos, o grupo controle (D - tratadas apenas com DMSO a 0,01%) e o grupo teste (M - tratadas com MST-312 a 2µM) e foram tratadas por 18 semanas.

4.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DO MTT

As células foram colocadas em placa de 96 poços e a viabilidade foi mensurada (em grupos de 8 poços, referentes à cada concentração usada) pelo ensaio de MTT. O meio de cultura foi trocado e o MTT dissolvido em tampão fosfato colocado 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) (CARMICHAEL et al., 1987). Para quantificar a

viabilidade, a placa foi submetida a espectrofotometria e a absorbância medida utilizando um leitor de microplacas em um comprimento de onda de 630 nm.

4.5 DETERMINAÇÃO DE IC_{50%}

Foi realizado o tratamento das culturas com concentrações crescentes da droga preparadas por diluição sequencial. Após 72 horas de exposição (tempo inferior ao necessário para observação de efeitos resultantes do encurtamento dos telômeros) a viabilidade foi avaliada pelo teste do MTT. Todos os experimentos foram efetuados em placas de 96 poços e constaram de um grupo controle em que as células foram tratadas apenas com os veículos DMSO a 0,1% e DMSO 0%. Os valores de absorbância foram mensurados e os dados foram expressos relativamente como percentual do grupo controle sem tratamento, cuja média, ou mediana (dependente da distribuição dos dados), corresponde a 100% de viabilidade, e foram submetidos à análise estatística adequada, incluindo cálculo de IC_{50%} por regressão não linear.

4.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

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

4.7 AVALIAÇÃO DE SENESCÊNCIA CELULAR

Foi utilizado o kit de avaliação de senescência celular β -galactosidase (CellSignaling). Neste ensaio colorimétrico é observado o acúmulo da enzima β -galactosidase nos lisossomos, que ocorre naturalmente durante o processo de envelhecimento celular. Após o tratamento de interesse, o meio de cultura foi removido das placas e as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato-salino), incubadas durante 10 minutos com o fixador do kit, lavou-se novamente com PBS e incubou-se a 37°C *overnight* com um mix de solução beta-gal de acordo com o protocolo do fabricante. A leitura foi realizada com microscopia de contraste de fase.

4.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE TELOMERASE

O RNA total foi extraído a partir de células tratadas com MST-312 (Grupo M) e de células tratadas com DMSO 0,01% (Grupo D) usando *TRizo*® (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi quantificado utilizando NanoVue. O total de 2 µg de RNA foi utilizado para o processo de síntese de cDNA utilizando o protocolo do kit de acordo com instruções do fabricante (Promega #316). A reação de PCR em tempo real foi então realizada no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) utilizando enzima TaqMan, os ensaios TaqMan para expressão gênica dos genes de *β-actina* e *hTERT*, e os iniciadores de sequências (5'-GCTGCTCAGGTCTTTCTTTTATG-3' e 5'-CGACGTAGTCCATGTTCAAA-3').

Os resultados foram normalizados segundo a expressão do gene endógeno de *β-actina*. A reação foi realizada sob as seguintes condições: 5 minutos de espera inicial a 95° C, 45 ciclos de 95° C durante 10 segundos, 57°C durante 10 segundos e 72°C durante 15 segundos, com um 1 minuto a 65°C antes do arrefecimento a 4°C.

Para a análise dos dados de expressão gênica por PCR em tempo real, foi utilizada a metodologia de Delta-Delta- Ct ($\Delta\Delta Ct$), na qual se calcula o ΔCt de cada amostra subtraindo o valor do Ct (ciclo no threshold) do gene controle do valor de ΔCt do gene alvo. Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ foi utilizada a fórmula [$\Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{controle})$], e posteriormente $2^{-\Delta\Delta Ct}$, resultando no valor da expressão gênica relativa.

4.9 ANÁLISE DE CARIÓTIPO

O tratamento foi feito com 5% de colchicina no meio de cultura durante 1 hora a 37° C. Após esse período, as células foram transferidas para um tubo, em suspensão numa solução hipotônica (0,075M KCl) por 10 minutos e, em seguida, fixadas em solução (metanol e ácido acético). As amostras foram colocadas em lâminas, que foram coradas com Giemsa 5% e digitalizadas com scanner ScanscopeCS Aperio. As imagens aumentadas 20 vezes foram analisadas com o software ImageScope e o número de espalhamentos metafásicos com cromossomos de características normais ou de aberrações morfológicas foram contabilizados para a determinação do índice mitótico de cada grupo. Não foram contabilizadas

aberrações numéricas. No total, foram contados 1.650 células MCF-7 do Grupo D, 1.229 células do Grupo M, 3.435 células MDA-MB-231 do Grupo D e 3.260 células do Grupo M.

4.10 TAMANHO RELATIVO DOS TELÔMEROS

A quantificação do tamanho dos telômeros foi realizada por qPCR utilizando SYBR green como descrito por O'CALLAGHAN e FENECH, 2011. Na Tabela 3 seguem as sequências dos iniciadores utilizados na reação.

Tabela 3 – Sequências de iniciadores e nucleotídeos utilizadas no ensaio de Tamanho Relativo de Telômeros (CHOI *et al.*, 2015). O *Telômero Standard* e o *36B4 Standard* são nucleotídeos sintéticos.

Gene	Sequências
<i>hTERT</i>	F: 5'-ATG CGA CAG TTC GTG GCT CA-3' R: 5'-ATC CCC TGG CAC TGG ACG TA-3'
<i>Telômero Standard</i>	5'-TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG-3'
<i>36B4 Standard</i>	5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CCG TCT CCA CAG ACA AGG CCA GGA CTC GTT TGT ACC CGT TGA TGA TAG AAT GGG-3'
<i>Telômero</i>	F: 5'-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3' R: 5'-GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-3'
<i>36B4</i>	F: 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC-3' R: 5'-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'- AAA TCA AGT GGG GCG ATG CTG-3' R: 5'- GCA GAG ATG ATG ACC CTT TTG-3'

4.11 TAXA DE PROLIFERAÇÃO

Durante o período de tratamento de 18 semanas foi feito o acompanhamento do desenvolvimento das culturas e seu potencial proliferativo através dos registros de quantidade de células viáveis e inviáveis. A cada passagem era realizada a contagem de células coradas com azul de tripan na câmara de Neubauer, e eram semeadas novamente 5000 células viáveis em placas de 30 mm, em ambos os grupos. Ao final do tratamento esses dados foram organizados em gráficos que demonstram a tendência do comportamento proliferativo de cada grupo.

Com os dados de células inviáveis foi possível determinar a taxa de mortalidade celular nos grupos estudados. O tempo de duplicação também foi definido após contagens a cada 12 horas, de culturas em fase de crescimento, plaqueadas em uma densidade de 30000 células por poço em placas de 24 poços, em triplicata, com o auxílio de azul de tripan.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram gerados de experimentos executados no mínimo, em triplicata, e receberam tratamento estatístico adequado, sendo expressos como média e erro médio padrão, ou mediana e percentil. A escolha da medida de tendência central e medidas de dispersão foram feitas de acordo com a distribuição dos dados em um histograma de frequência. O teste utilizado para cada análise foi especificado na apresentação dos resultados. Os mais utilizados foram os paramétricos *t de Student* não pareado para análise binária, *One-Way ANOVA* (seguido do teste de *Dunnnett*) para múltipla comparação com apenas um parâmetro variável e *Two-Way ANOVA* (seguido do teste de *Bonferroni*) para múltipla comparação com dois parâmetros variáveis, e os não paramétricos de *Mann-Whitney* para análise binária ou de *Kruskal-Wallis* (seguido do teste de *Dunn*) para múltipla comparação. Os valores de *p* considerados como estatisticamente significativos nas análises foram inferiores a 0,05.

Para definir os valores de $IC_{50\%}$ das amostras, foi utilizada a regressão não linear com valores logarítmicos e o coeficiente de determinação (R^2) aceito como crítico foi de 0,9.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS

As células de MDA-MB-231 e MCF-7 apresentaram expressão de *hTERT*, avaliada por ensaio de RT-PCR, que tornaram essas células competentes para os tratamentos com o inibidor de telomerase. Na Figura 7, é possível observar as bandas correspondentes aos *amplicons* do controle *GAPDH* e abaixo a banda mais clara que corresponde ao produto do *hTERT* nas linhagens selecionadas para este estudo.

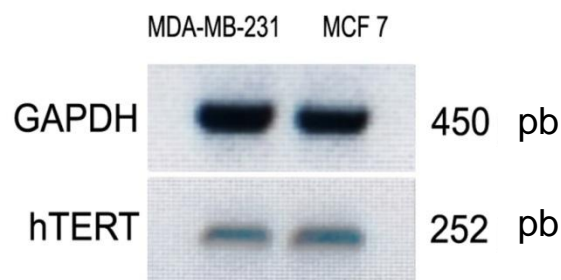


Figura 7. Expressão de *hTERT* das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

Ensaio para quantificar o tamanho médio dos telômeros foram realizados nas linhagens estudadas (Figura 8), e demonstraram que as células de MDA-MB-231 apresentam telômeros maiores comparados com os das células de MCF-7.

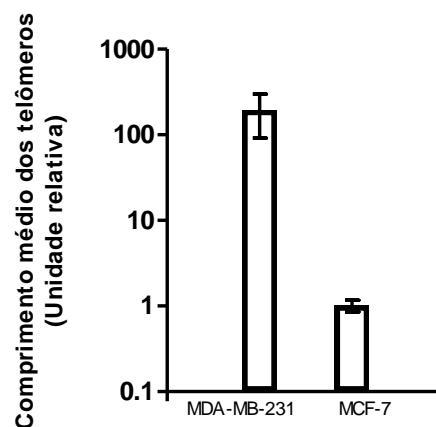


Figura 8. Tamanho Médio dos Telômeros em escala logarítmica.

Foram determinados os valores de tempo de duplicação das linhagens usadas, que informa quanto tempo é necessário para cada cultura celular dobrar de tamanho, apresentado na Tabela 4. A linhagem MDA-MB-231 leva em média 24 horas enquanto que a MCF-7 precisa de aproximadamente 35 horas para dobrar de tamanho.

Tabela 4 - Comparação do tempo de duplicação das linhagens utilizadas.

Linhagem Celular	MCF-7	MDA-MB-231
Tempo de Duplicação	35 horas	24 horas

Os dados coletados na caracterização das linhagens selecionadas estão dispostos na Tabela 5, com o objetivo de facilitar a comparação:

Tabela 5 - Caracterização das linhagens com os dados de expressão de *hTERT*; Comprimento médio dos telômeros e tempo de duplicação (comparação entre as linhagens).

Caracterização das Linhagens	MCF-7	MDA-MB-231
Expressão de <i>hTERT</i>	Sim	Sim
Comprimento dos Telômeros	Menor	Maior
Tempo de Duplicação	24 horas	35 horas

5.2 TRATAMENTO À CURTO PRAZO

No tratamento das células MCF-7 foi possível observar um comportamento dose-dependente com diferenças significativas a partir da concentração de 5 μ M, e posteriormente nas concentrações de 10 μ M, 15 μ M, 25 μ M e 50 μ M. Nas células MDAMB-231 também se pode observar que o efeito é dose-dependente e houve diferenças estatísticas a partir de 10 μ M, e também em 15 μ M, 25 μ M, 35 μ M e 50 μ M, como demonstrado na Figura 9.

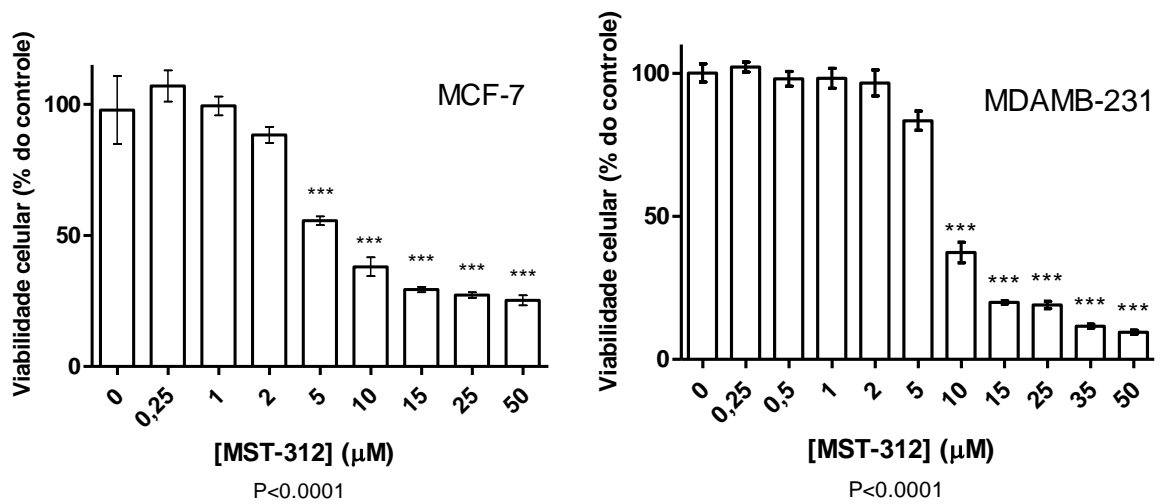


Figura 9. Citotoxicidade do tratamento à curto prazo em MCF-7 e MDA-MB-231. Os dados de viabilidade estão apresentados em percentual com relação ao controle. A coluna representada como 0 [MST-312] corresponde ao controle tratado com DMSO 0,1%, que é o diluente do MST-312. Os gráficos estão demonstrando os valores das médias e desvio padrão dos grupos, para a análise foi utilizado o teste Anova e pós teste Dunnett's.

Na Figura 10 a análise dos grupos controles DMSO 0% e DMSO 0,01% tratados no mesmo ensaio em que foi avaliada a viabilidade celular das células MDA-MB-231 e MCF-7, apresentando os valores de “p” entre os grupos.

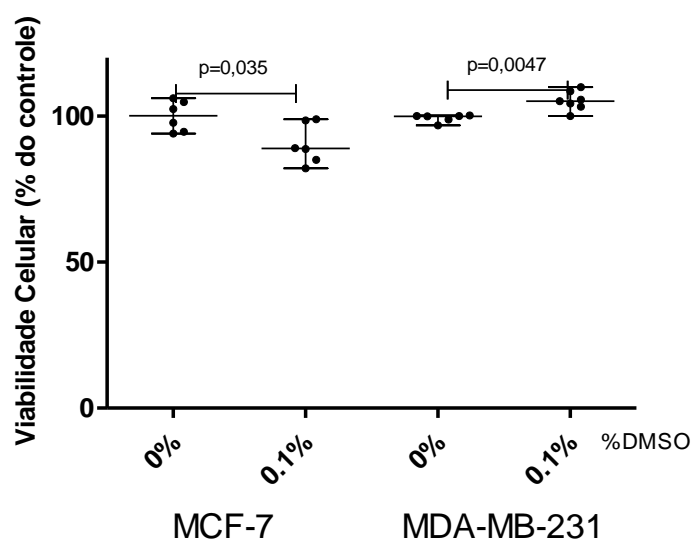


Figura 10. Viabilidade celular dos controles de MCF-7 e MDA-MB-231 nos tratamentos de curto prazo. Os dados de viabilidade estão apresentados em percentual com relação ao controle 0%. Para a análise estatística foi realizado o teste Mann Whitney com valores de “p” expressos no gráfico.

Nos ensaios de avaliação de senescência celular não houve indução de senescência em nenhum dos grupos de tratamento de curto prazo. Os dados de citotoxicidade possibilitaram determinar as concentrações subtóxicas que seriam utilizadas posteriormente nos tratamentos de longa exposição ao MST-312. Na Figura 11 estão dispostos os gráficos e valores de $IC_{50\%}$ de MCF-7, que foi determinado com a equação $Y = 22,76 + \frac{82,3}{1+10^{(LogIC_{50} - X) \cdot (-1,780)}}$, e o $IC_{50\%}$ de MDA-MB-231, que foi determinado com a equação $Y = 12,29 + \frac{86,72}{1+10^{(LogIC_{50} - X) \cdot (-8,865)}}$.

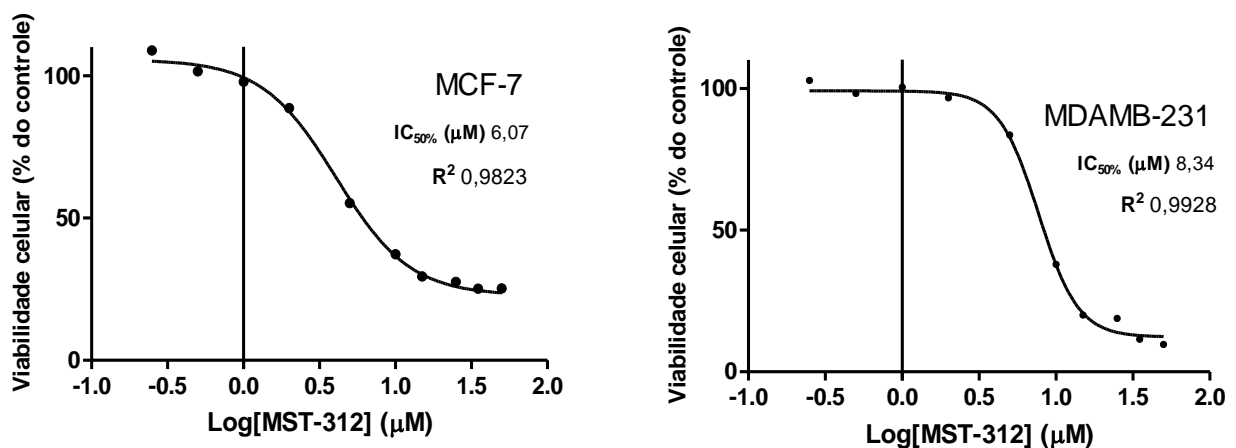


Figura 11. Dados de $IC_{50\%}$ de MCF-7 e MDAMB-231. Apresentados em função logarítima (concentração em Log e viabilidade em percentual em relação à viabilidade do controle), no modelo de regressão linear, onde a viabilidade diminui à medida que a concentração aumenta.

Na Tabela 6 é possível comparar os dados dos ensaios de tratamento a curto prazo com MST-312 das linhagens estudadas.

Tabela 6 - Comparação dos resultados das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 nos tratamentos de curto prazo.

Curto Prazo	MDA-MB-231	MCF-7
Viabilidade	Citotoxicidade a partir de 10 μ M	Citotoxicidade a partir de 5 μ M
$IC_{50\%}$	8,34 μ M	6,07 μ M
Senescência	Não apresentou	Não apresentou
[MST-312] Subtóxica	2 μ M	

5.3 TRATAMENTO À LONGO PRAZO DE MDA-MB-231

Os dados mostram que até 75 dias de exposição ao MST-312, as células têm um comportamento semelhante quanto à duplicação. Após esse período, o Grupo M apresenta maior capacidade de se proliferar, como ilustrado na Figura 12. O tempo de duplicação do Grupo D após a 18ª semana de tratamento foi de 58,34 horas e do Grupo M de 32,07 horas.

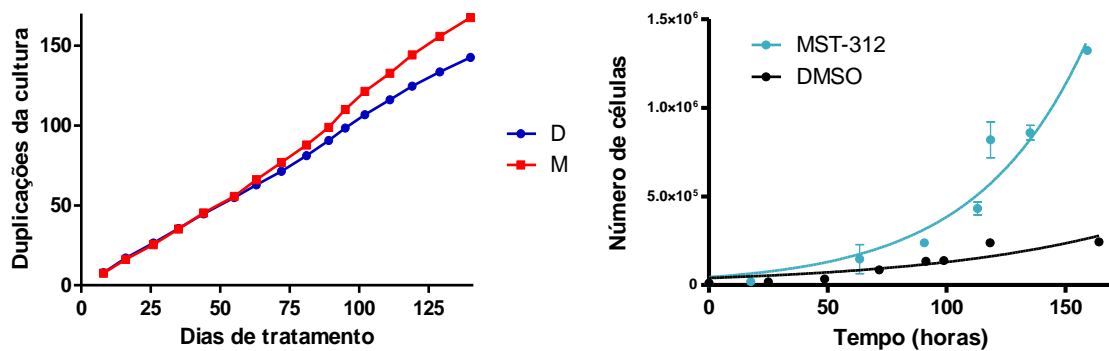


Figura 12. Comportamento proliferativo da linhagem MDA-MB-231 no tratamento de longo prazo. À esquerda, o gráfico de duplicações da cultura de MDA-MB-231 em dias de tratamento, onde a linha em azul representa o Grupo D (tratado com DMSO 0,01%) e a linha vermelha representa o Grupo M (tratado com MST-312 2 μ M). À direita, a curva de proliferação da linhagem MDA-MB-231, em ensaio realizado após as 18 semanas de tratamento.

Os resultados da análise de viabilidade demonstram que há toxicidade dose-dependente em ambos os grupos, com diferenças estatísticas a partir da concentração de 10 μ M, seguidos de 15 μ M, 25 μ M, 35 μ M e 50 μ M, como demonstrado na Figura 13.

Foi realizada a análise entre os controles DMSO 0% e DMSO 0,01% dos grupo D (tratados com DMSO 0,01%) e grupo M (tratado com MST-312 a 2 μ M), com os valores expressos na Figura 14.

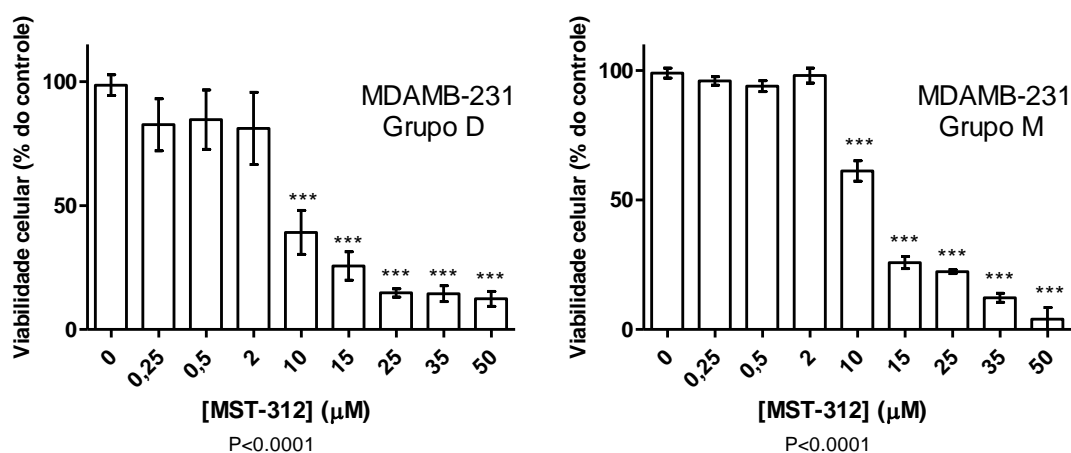


Figura 13. Citotoxicidade do MST-312 na linhagem MDA-MB-231 após exposição de 18 semanas. À esquerda os dados de viabilidade do Grupo D (tratados com DMSO 0,01%) e à direita os dados do Grupo M (tratados com MST-312). Os dados de viabilidade estão apresentados em percentual com relação ao controle. A coluna 0 [MST-312] corresponde ao grupo tratado com DMSO 0,1%. Os gráficos estão demonstrando os valores das médias e desvio padrão dos grupos. Para a análise foi utilizado o teste Anova e pós teste Dunnett's.

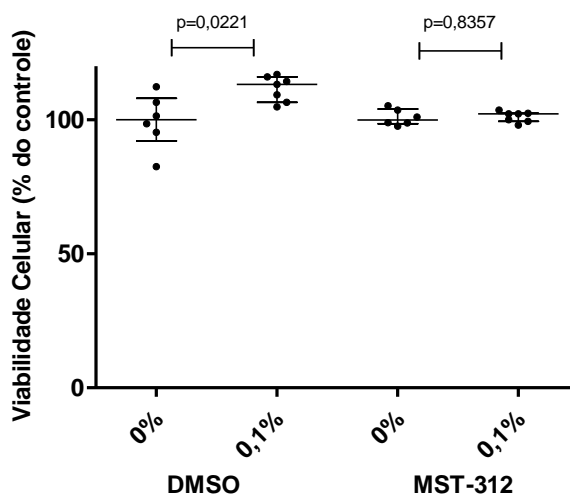


Figura 14. Viabilidade celular dos controles de MDA-MB-231 nos tratamentos de longo prazo. O gráfico está demonstrando os valores das medianas dos grupos. Os dados de viabilidade estão apresentados em percentual com relação ao controle sem DMSO. A análise estatística foi feita pelo teste Mann Whitney entre os grupos 0% DMSO e 0,1% DMSO de cada tratamento.

Foi determinado o valor de $IC_{50\%}$ dos grupos após a exposição de longo prazo. Na Figura 15 é possível comparar o $IC_{50\%}$ dos grupos de MDA-MB-231 em células sem tratamento prévio, tratadas com DMSO 0,1% e tratadas com MST-312. Para o Grupo DMSO, os valores de R^2 são 0,9361 e $IC_{50\%}$ 7,8 μ M, com $IC_{50\%}$ obtido através da equação $Y = 11,50 + \frac{72,08}{1+10^{(\text{Log}IC_{50}-X)\cdot(-2,482)}}$. No Grupo MST-312, os valores de R^2 são 0,9848 e $IC_{50\%}$ 11,24 μ M, com $IC_{50\%}$ calculado através da equação $Y = 9,227 + \frac{86,043}{1+10^{(\text{Log}IC_{50}-X)\cdot(-3,822)}}$.

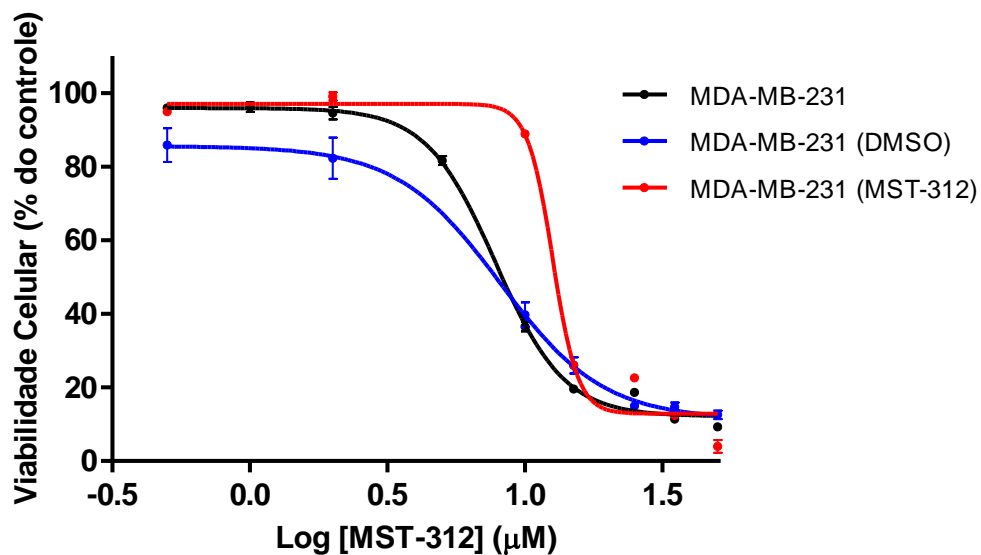


Figura 15. Curvas dose-resposta de MST-312 para células MDA-MB-231 após 72 horas de tratamento. O experimento foi feito com células submetidas ao tratamento de longo prazo com MST-312 a 2 μ M ou DMSO a 0,1%, estas foram expostas a concentrações crescentes do MST-312 e tiveram os valores de viabilidade apresentados em função logarítmica no modelo de regressão linear. A curva de toxicidade da linhagem original (grupo representado em preto) foi adicionada como parâmetro de referência.

Durante o acompanhamento das células no ensaio de $IC_{50\%}$ foi possível observar diferenças entre os grupos D e M, quanto à confluência e à quantidade de células não aderidas, principalmente na concentração de 10 μ M (Figura 16).

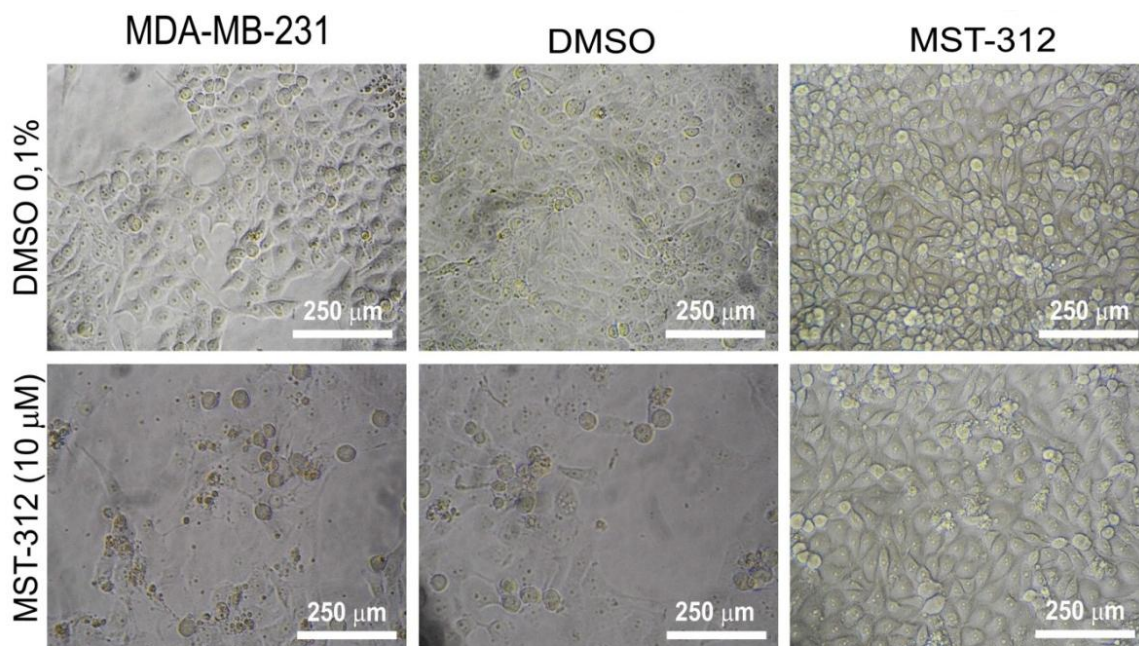


Figura 16. Micrografia das células MDA-MB-231 demonstrando a sua confluência nos tratamentos de DMSO 0,1% e MST-312 [10µM]. Grupo controle sem tratamento prévio (à esquerda), tratadas com DMSO 0,01% por 18 semanas (meio) e tratadas com MST-312 em dose subtóxica por 18 semanas (à direita).

Houve maior porcentagem de células inviáveis nos grupos sem tratamento e com tratamento de DMSO 0,01% por 18 semanas, enquanto que o grupo tratado por 18 semanas com MST-312, apresentou uma porcentagem muito inferior de células inviáveis. Na figura 17, a quantificação do fenômeno observado nas micrografias, através dos valores de absorbância coletados após ensaio de MTT.

Os ensaios de β -Galactosidase não demonstraram sinais de senescência em nenhum dos grupos testados para as células da linhagem MDA-MB-231. Também não foram observadas alterações morfológicas das culturas durante e após o tratamento. O índice mitótico para o grupo D foi de 3,17% e para o grupo M foi de 2,73%. As porcentagens de aberrações para os grupos D e M foram respectivamente 5,5% e 5,6%; foram observados cariótipos característicos de crise mitótica no grupo D em 0,91% das células e no grupo M em 2,24% (Figura 18).

No ensaio para avaliar o tamanho médio dos telômeros (Figura 19), embora não haja diferença estatística entre os grupos devido à distribuição dos dados, parece haver uma tendência do tamanho dos telômeros do Grupo D ser maior que os do Grupo M.

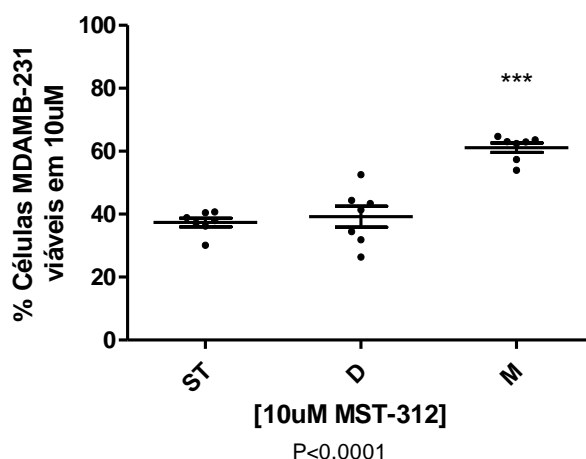


Figura 17. Porcentagem de células MDA-MB-231 viáveis na concentração de 10 μ M de MST-312. ST representa os dados das células sem tratamento prévio, D do grupo DMSO e M representa o grupo MST-312, após 18 semanas de tratamento. O gráfico está demonstrando os valores individuais e a média de cada grupo. O teste utilizado foi o ANOVA e pós teste Dunnetts.

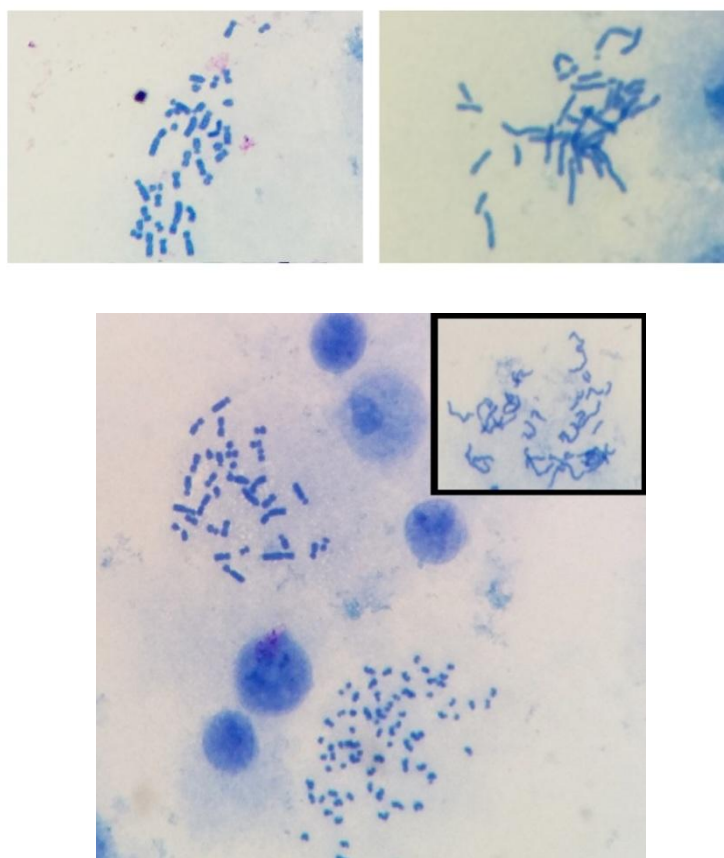


Figura 18. Micrografias de cariótipos de células MDA-MB-231. Cromossomos normais (superior à esquerda) e alterações cromossômicas (superior à direita). Variedade de cariótipos dentro do mesmo grupo (Inferior) no detalhe, figura característica de crise telomérica.

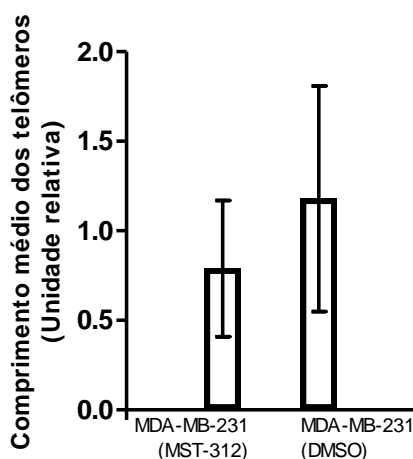


Figura 19. Tamanho médio dos Telômeros dos grupos M e D de MDA-MB-231.

5.4 TRATAMENTO À LONGO PRAZO DE MCF-7

Os dados mostram que próximo de 20 dias de exposição ao MST-312, as células começam a apresentar um comportamento diferente entre os grupos quanto à duplicação. Após esse período, o Grupo M apresenta uma discreta diminuição na capacidade de proliferação que vai se acentuando ao longo do tempo, como ilustrado na Figura 20. O tempo de duplicação do Grupo D após as 18 semanas de tratamento foi de 39 horas e do Grupo M de 44,98 horas.

Os dados demonstram toxicidade dose-dependente tanto no Grupo tratado com DMSO, quanto no Grupo com MST-312, em proporções diferentes. Entretanto, é possível constatar em ambos os grupos, diferença estatística a partir da concentração de 5 μM , e posteriormente 10 μM , 15 μM , 25 μM e 35 μM (Figura 21).

Na Figura 22 o gráfico que faz a análise entre os grupos controles DMSO 0% e com DMSO a 0,1%.

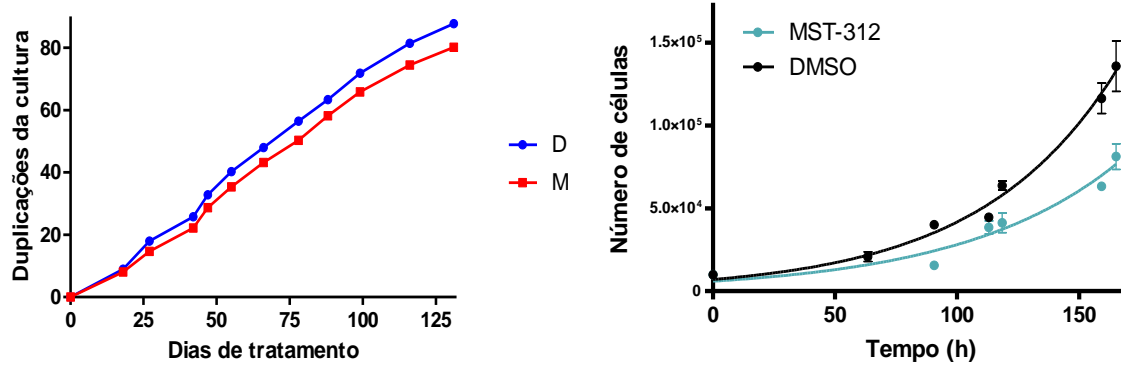


Figura 20. Comportamento proliferativo da linhagem MCF-7 no tratamento de longo prazo. À esquerda, o gráfico de duplicações da cultura de MCF-7 expressa em dias de tratamento, onde a linha em azul representa o Grupo D (tratado com DMSO 0,1%) e a linha vermelha representa o Grupo M (tratado com MST-312 2 μ M). À direita, a curva de proliferação da linhagem MDA-MB-231, em ensaio realizado após as 18 semanas de tratamento.

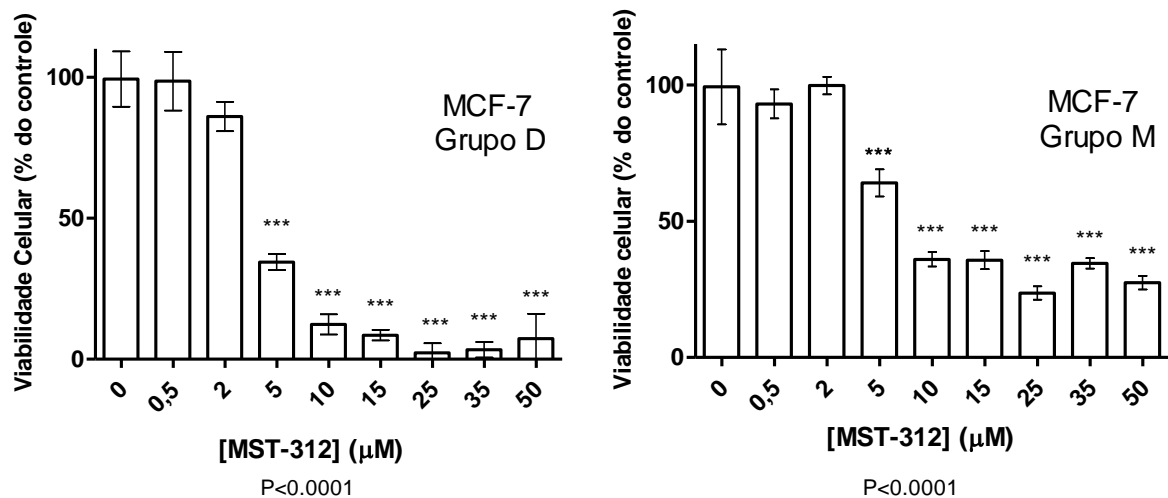


Figura 21. Citotoxicidade do MST-312 na linhagem MCF-7 após exposição de 18 semanas. À esquerda os dados de viabilidade do Grupo D (tratados com DMSO 0,01%) e à direita os dados do Grupo M (tratados com MST-312). Os dados de viabilidade estão apresentados em percentual com relação ao controle. A coluna 0 [MST-312] corresponde ao grupo tratado com DMSO 0,1%. Os gráficos estão demonstrando os valores das médias e desvio padrão dos grupos. Para a análise foi utilizado o teste Anova e pós teste Dunnett's.

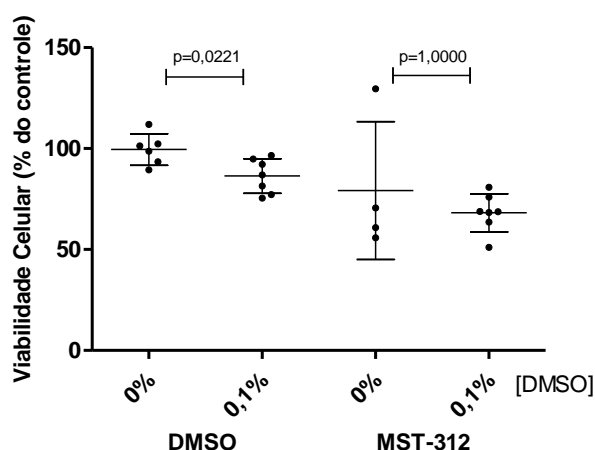


Figura 22. Viabilidade celular dos controles de MCF-7 nos tratamentos de longo prazo. O gráfico está demonstrando os valores das medianas dos grupos. Os dados de viabilidade estão apresentados em percentual com relação ao controle sem DMSO. A análise estatística foi feita através do Teste Mann Whitney entre os grupos 0% DMSO e 0,1% DMSO de cada tratamento.

Foi determinado o valor de $IC_{50\%}$ dos grupos após a exposição de longo prazo ao MST-312. Na Figura 23 é possível comparar o $IC_{50\%}$ dos grupos de MCF-7 em células sem tratamento prévio, tratadas com DMSO 0,1% e tratadas com MST-312. Para o Grupo DMSO, os valores de R^2 são 0,9766 e $IC_{50\%}$ 3,97 μM , com $IC_{50\%}$ obtido através da equação $Y = 4,940 + \frac{89,39}{1 + 10^{(\text{Log}IC_{50} - X) \cdot (-2,907)}}$. No Grupo MST-312, os valores de R^2 são 0,8884 e $IC_{50\%}$ 6,39 μM , com $IC_{50\%}$ calculado através da equação $Y = 30,44 + \frac{58,58}{1 + 10^{(\text{Log}IC_{50} - X) \cdot (-4,865)}}$.

Foi observada uma discrepância na ação tóxica do MST, nas células sem tratamento prévio, e nas células do Grupo D e M, na concentração de 1 μM . Houve maior porcentagem de células inviáveis nos grupos M e D, respectivamente, em comparação com os dados do grupo sem tratamento (Figura 24). A morfologia das células do Grupo M, no ensaio de citotoxicidade na concentração de 1 μM , apresentou citoplasma mais abundante e com bordas menos definidas, além de menor confluência celular.

Após análise (MTT), foi possível quantificar a porcentagem de células inviáveis na concentração de 1 μM , no grupo controle sem tratamento prévio, no Grupo D (tratado com DMSO) e no Grupo M (tratado com MST-312), demonstrando

que há diferença significativa na quantidade de células inviáveis entre os grupos D e M, quando comparados com o grupo controle sem tratamento prévio (Figura 25).

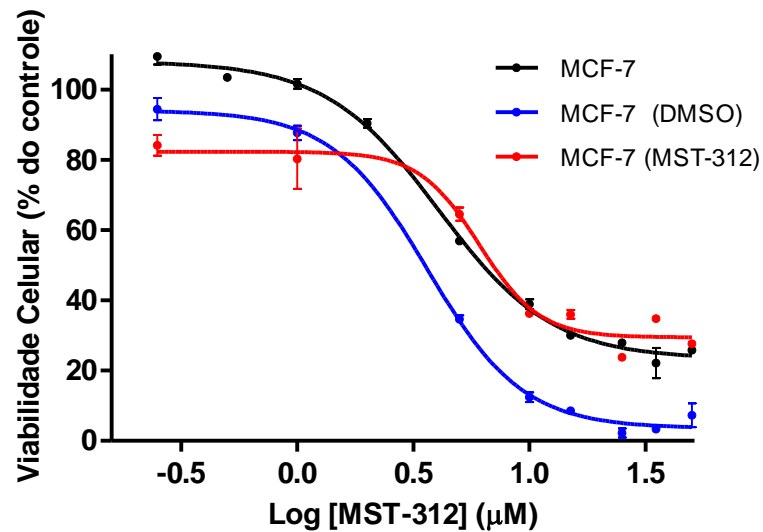


Figura 23. Curvas dose-resposta de MST-312 para células MCF-7 após 72 horas de tratamento. O experimento foi feito com células submetidas ao tratamento de longo prazo com MST-312 a 2µM ou DMSO a 0,01%, estas foram expostas a concentrações crescentes do MST-312 e tiveram os valores de viabilidade apresentados em função logarítmica no modelo de regressão linear. A curva de toxicidade da linhagem original (grupo representado em preto) foi adicionada como parâmetro de referência.

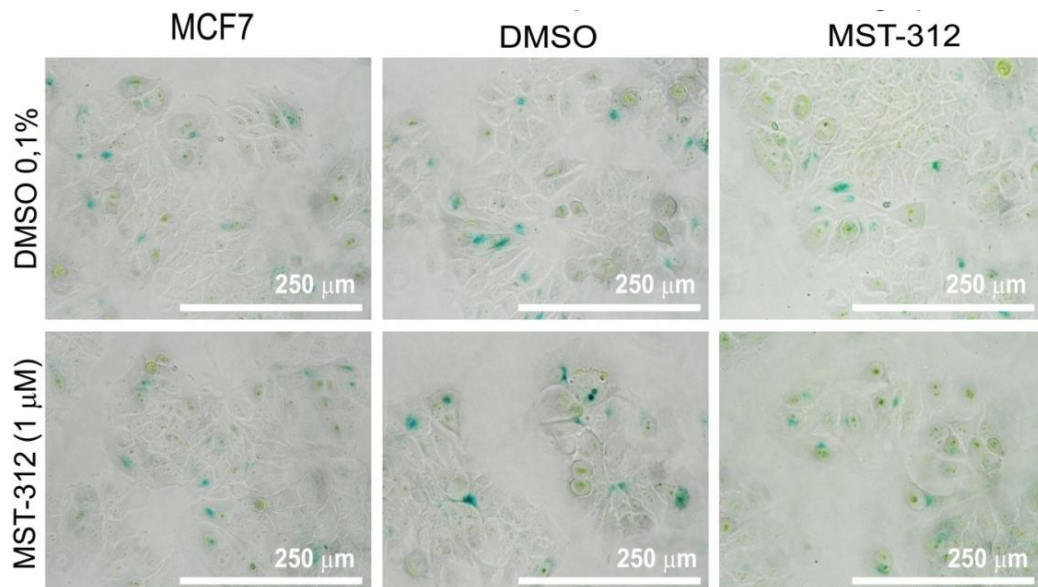


Figura 24. Micrografia de células MCF-7 demonstrando as suas características morfológicas nos tratamentos de DMSO 0,1% E MST-312 [1 µM]. Grupos sem tratamento prévio (à esquerda), tratadas com DMSO 0,1% (meio) e tratadas com MST-312 (à direita). É possível também observar a marcação em azul que sinaliza senescência em todos os grupos.

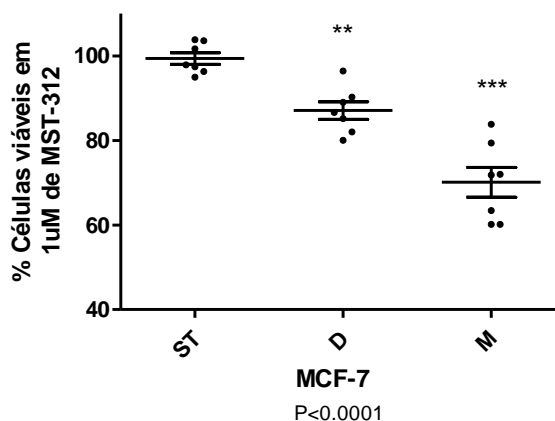


Figura 25. Porcentagem de células viáveis na concentração de 1 μ M. ST representa os dados das células sem tratamento prévio, D do grupo DMSO e M representa o grupo MST-312, após 18 semanas de tratamento. O gráfico está demonstrando os valores individuais e a média de cada grupo. O teste utilizado foi o ANOVA e pós teste Dunnetts.

A avaliação de senescência foi realizada por meio de ensaio de β -galactosidase nas células MCF-7. A linhagem apresentou células senescentes (observadas através da coloração em azul) em ambos os grupos estudados (Figura 26), D e M, porém o tratamento com o inibidor aumentou a quantidade dessas células.

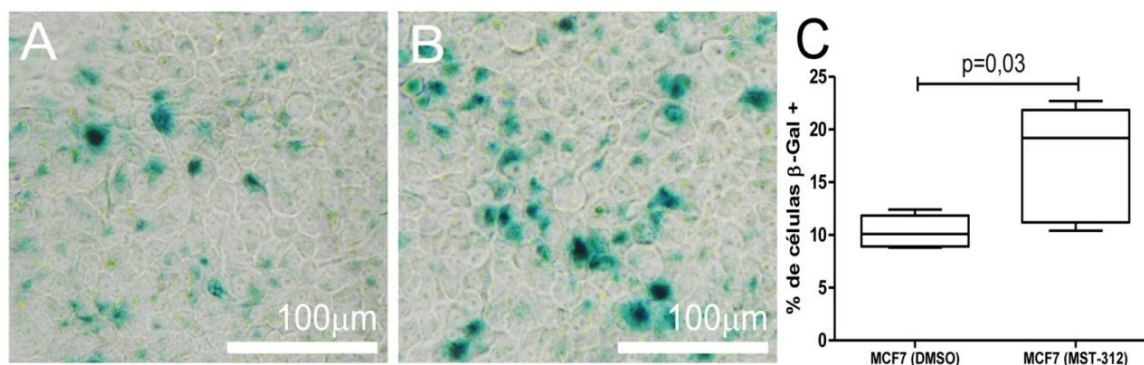


Figura 26. Micrografia e gráfico das células MCF-7 nos ensaios de senescência celular. (A) Micrografia de células MCF-7 no meio com DMSO 0,01% apresentando sinais de senescência. (B) Micrografia de células MCF-7 no meio com o MST-312, apresentando sinais de senescência. (C) Gráfico representando o percentual de células senescentes em cada grupo.

O índice mitótico do grupo D foi 2,18% e do grupo M de 3,01%, e dessas células em estado de mitose 13,88% apresentaram cariótipo aberrante no grupo D e

18,91% no grupo M que teve também 2,07% de cariótipos com configuração característica de crise mitótica. O grupo D não apresentou nenhum cariótipo característico de crise (Figura 27).

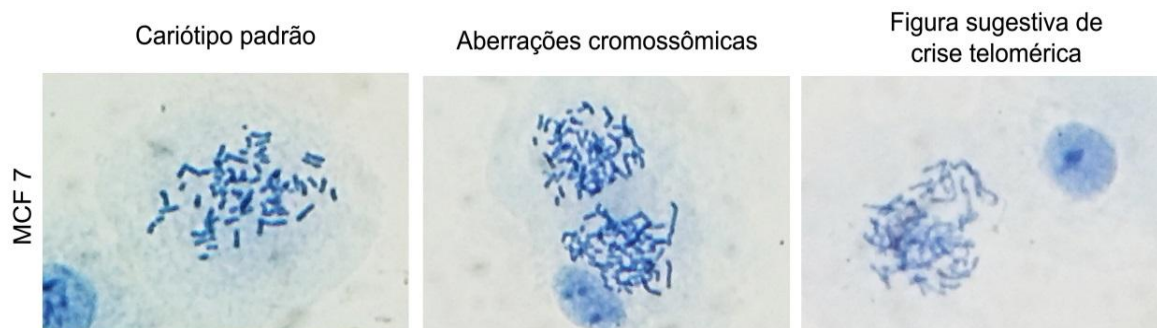


Figura 27. Micrografia de cariótipos de MCF-7 após 18 semanas de tratamento. As imagens demonstram a variedade de cariótipos de uma mesma linhagem (MCF-7). Apenas aberrações morfológicas foram quantificadas.

A análise da expressão gênica da telomerase por PCR convencional revelou que após o longo período de exposição ao MST-312, as células de MCF-7 do Grupo M apresentaram maior expressão de *hTERT* do que as células do Grupo D. Resultado que foi confirmado com o ensaio de q-PCR (Figura 28).

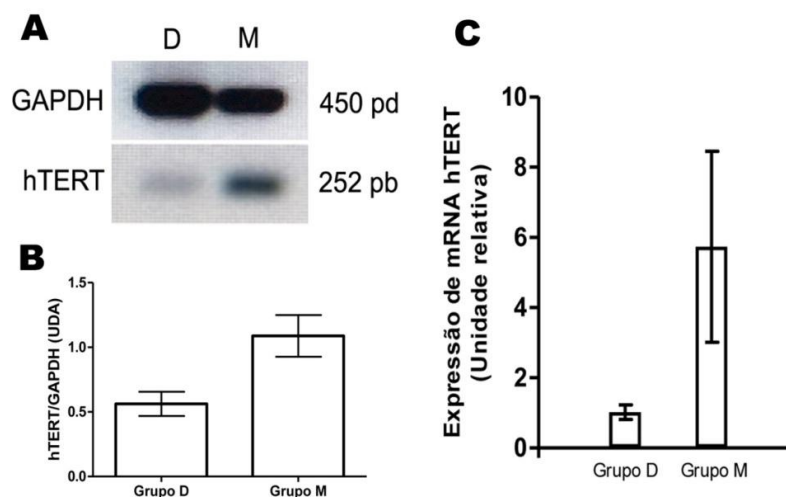


Figura 28. Expressão de *hTERT* em células MCF7 dos Grupos D e M. (A) Gel de agarose com os produtos amplificados por RT-PCR demonstrando a expressão de *hTERT* e do controle *GAPDH*. (B) Quantificação do gel por densitometria onde UDA é unidade densitométrica arbitrária. (C) Confirmação do resultado por q-PCR (relativa à expressão do gene endógeno Beta-actina).

Nos ensaios de Tamanho médio de Telômero não foi possível identificar diferenças significativas entre os grupos M e D (Figura 29).

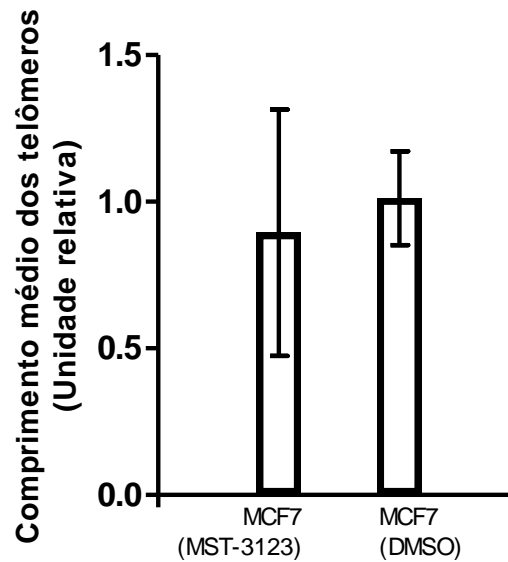


Figura 29. Tamanho médio dos Telômeros dos grupos M e D de MCF-7.

Na Tabela 7 estão dispostos todos os dados dos ensaios realizados com as células de ambas as linhagens após a exposição de 18 semanas ao MST-312, de todos os grupos tratados, para facilitar a comparação dos resultados e diferenças entre as linhagens.

Tabela 7 - Comparação entre os dados obtidos dos ensaios realizados com as linhagens estudadas. (*) Em relação ao Grupo D. (**) Em relação ao Grupo M.

Longo Prazo	MCF-7		MDA-MB-231	
	Grupo D DMSO 0,1%	Grupo D DMSO 0,1%	Grupo M MST-312 2µM	Grupo M MST-312 2µM
Tempo de Duplicação	39 horas	58,34 horas	32,07 horas	44,98 horas
Curva de Proliferação	-	-	Proliferação mais intensa após 75 dias*	Proliferação mais lenta após 20 dias*
Viabilidade	Citotoxicidade a partir de 5 µM	Citotoxicidade a partir de 10 µM	Citotoxicidade a partir de 10 µM	Citotoxicidade a partir de 5 µM
Alterações específicas	Maior % células viáveis em 1 µM**	-	Maior % células viáveis em 10 µM*	-
IC50%	3,97 µM	7,8 µM	11,24 µM	6,39 µM
Senescência	Apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Apresentou em maior proporção*
Índice Mitótico %Aberrações %Crise	2,18% 13,88% 0%	3,17% 5,5% 0,91%	2,73% 5,6% 2,24%	3,01% 18,91% 2,70%
Tamanho médio dos telômeros	-	-	Não apresentou diferença*	Não apresentou diferença*
Expressão relativa de <i>hTERT</i>	Redução da expressão**	-	-	-

6 DISCUSSÃO

A possibilidade do uso de inibidores de telomerase na clínica oncológica pode ser traduzida em teoria, como uma droga capaz de ser eficaz em 85% dos casos de câncer e não ter ação nas células somáticas, que não expressam a telomerase. Porém, assim como outras drogas já utilizadas, existe a implicação do uso prolongado, que no caso do MST-312, não haviam referências na literatura demonstrando seus efeitos *in vitro* em tratamento de longo prazo, como foi demonstrado neste estudo.

Os resultados dos experimentos de viabilidade celular nos tratamentos de curto prazo (72 horas) sugerem que o MST-312 teve uma ação citotóxica não necessariamente relacionada com a crise telomérica provocada pela inibição da telomerase. Nas células tratadas com concentrações a partir de 5 μM em MCF-7 e 10 μM em MDA-MB-231 já foi possível observar citotoxicidade e morte celular significativas com relação ao controle. A morte celular observada pode não ter ocorrido em função do encurtamento dos telômeros, que por sua vez, ocorre em torno de 60 ciclos, em células normais.

Outros trabalhos também demonstram efeito citotóxico do MST-312 em curto prazo em células de câncer. Achados de redução da atividade da telomerase, apoptose mediada por supressão de genes anti-apoptóticos regulados pela NF- $\kappa\beta$ (fator nuclear kapa beta) e genes relacionados com a telomerase, evidenciam que o MST-312 pode ter outros sítios de ação nas células (FATEMI *et al.*, 2015).

Em estudos com linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 os efeitos puderam ser observados já com 48 horas de tratamento. Houve redução de aproximadamente 40% na atividade da enzima tanto em MDA-MB-231 como em MCF-7 na concentração de 1 μM de MST-312, indução de lesão ao DNA com supressão da proteína TRF-2 (essencial para a proteção do telômero e formação do complexo shelterina) e indução da proteína p53. (GURUNG *et al.*, 2015). Evidências sugerem que o complexo shelterina pode regular o alongamento do telômero, através da associação de seus componentes (TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, POT1, e TPP1) com a região de cadeia dupla do telômero com interações diretas de TRF1 e TRF2 com o DNA (ABREU *et al.*, 2010).

Outras drogas que agem como inibidoras da telomerase já foram descritas com efeitos em curto prazo. O BRACO-19 (Tri-hidrocloreto de N,N'-(9-(4-

(Dimetilamino)fenilamino)acridina-3,6-di)bis(3-(pirrolidin-1-il)propanamida) em estudo *in vitro*, demonstrou reduzir a expressão de hTERT em 24 horas, com indução de senescência celular e parada do crescimento em 15 dias de exposição, acompanhado do encurtamento dos telômeros (BURGER *et al.*, 2016); inclusive em células MCF-7 após 39 dias de exposição (DAI *et al.*, 2002). Esse composto também suprimiu a proliferação e reduziu a atividade da telomerase em células de glioblastoma humano, provocando extensos danos no DNA, resultando em fusão dos telômeros e parada do ciclo celular mediada por p21, apoptose e senescência (ZHOU *et al.*, 2016).

O alcaloide β -carbonílico harmina também já foi descrito como inibidor de telomerase em células MCF-7, induzindo a senescência e sub-expressão de p53/p21, com inibição da proliferação e da atividade da telomerase, após 96 horas de exposição a 20 μ M (ZHAO e WINK, 2013). O Imetelstat é um antagonista do molde de hTR, resistente à nucleases e ácidos. É capaz de formar uma dúplice estável com o molde de hTR, inibindo assim a atividade da telomerase de forma competitiva (UZIEL e LAHAV, 2014) já testado em linhagens de adenocarcinoma de pâncreas com exposição contínua, levando à crise e uma completa perda de viabilidade após 47 duplicações, acompanhado por lesões ao DNA, senescência e apoptose (BURCHETT *et al.*, 2014).

Essas evidências indicam que em curto período de exposição ao inibidor de telomerase, algumas alterações celulares podem ser observadas, além do efeito esperado de encurtamento do telômero. Alterações estas que podem não ser tão pronunciadas quando ocorre exposição por longos períodos, ou que são mais relevantes nos primeiros dias de exposição. A própria inibição da telomerase, que por sua vez possui outras funções na célula além da síntese de DNA telomérico (como regulação na proliferação celular, estabilidade do genoma e proteção contra apoptose, por exemplo), pode ter gerado outras consequências que não estão relacionadas com a sua função catalítica (REDDEL, 2014).

Embora a resposta ao tratamento de curto prazo tenha sido semelhante para MDA-MB-231 e MCF-7, nos tratamentos de longo prazo as linhagens comportaram-se diferentemente frente ao mesmo inibidor. As células da linhagem de MCF-7 apresentaram retardo na capacidade proliferativa por volta de 20 dias de tratamento com o MST-312, assim como foi observado no estudo com células de leucemia

U937, utilizando o mesmo inibidor após 65 dias de tratamento (SEIMIYA *et al.*, 2002). As células MDA-MB-231 do grupo M mantiveram sua capacidade proliferativa próxima da encontrada no grupo D até 70 dias de tratamento, e seguiram mais competentes até o final do tratamento.

Após todo o período de tratamento, as células foram submetidas novamente aos ensaios de viabilidade e IC_{50%}, no intuito de comparar a resposta celular com a obtida antes da exposição prolongada. Os valores de IC_{50%} das células sem tratamento foi de 8,34 µM, para o grupo tratado somente com DMSO foi de 7,8 µM e para o grupo tratado com MST-312 foi de 11,24 µM. Os dados revelam que após esse longo contato com a droga, o IC_{50%} aumenta discretamente.

Nos experimentos com a linhagem MCF-7, foi possível constatar o efeito dose-dependente com citotoxicidade acentuada a partir da concentração de 5 µM. O IC_{50%} do Grupo D foi de 3,97 µM e do grupo M foi de 6,39 µM, enquanto que a linhagem original apresentou IC_{50%} de 6,07 µM. A alteração da sensibilidade foi mais pronunciada no grupo D do que no grupo M, que por sua vez, ficou próxima das células controle.

O objetivo de expor as células por longo tratamento era visualizar os efeitos do MST-312 após várias semanas. Permitindo avaliar o potencial terapêutico deste antitumoral em uso análogo ao que se tem na clínica, por outros antitumorais. Mas principalmente fornecer tempo hábil para que houvesse encurtamento dos telômeros e suas consequências celulares.

A análise do efeito do inibidor a 10 µM de MST-312 demonstra que a linhagem MDA-MB-231 se torna mais resistente a sua ação nesta concentração. Nas micrografias também é possível observar uma mudança na confluência das células cultivadas com inibidor à uma concentração de 10 µM, com percentual de células inviáveis de 62,08% e 60,8% para os grupos sem tratamento e tratados com DMSO e de 38,8% para o grupo tratado com o inibidor (p=0,0001). Durante este período de pressão seletiva, é possível que se tenha propiciado a manutenção de células com resistência adquirida ao inibidor, que pode também ser observada *in vitro* (HUBER *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2013; LOGANZO *et al.*, 2015).

As vias de sinalização celular vêm sendo bastante estudadas nos últimos anos, e tem se revelado verdadeiramente redundantes, pois se um recurso é

importante para a viabilidade de determinada célula, ela provavelmente buscará mecanismos para alcançá-lo (BELLON e NICOT, 2015). A inibição de alvos moleculares tem como objetivo menor toxicidade e mais especificidade, mas pode desencadear uma estratégia diferente para que aquela ação ocorra. A pressão seletiva imposta por terapia pode ocorrer por mutação ou reprogramação epigenética e pode reestabelecer a capacidade funcional, servindo de base para a aquisição de resistência a medicamentos. Isto é evidenciado na clínica médica oncológica, onde pacientes oncológicos comumente demonstram respostas transitórias e recidivas agressivas (HUBER *et al.*, 2010).

As células MCF-7, na concentração de 1 μ M (que é inferior a usada durante todo o tratamento) demonstrou diferença significativa entre os grupos, que apresentaram 0,61% de células inviáveis no grupo sem tratamento, 13,34% de células inviáveis no grupo D e 29,87% no grupo M. Após longa exposição ficaram mais sensíveis à ação da droga, diferentemente das células da linhagem MDAMB-231. É também concebível que o encurtamento dos telômeros promovido pela inibição da telomerase pode resultar na desregulação da expressão do gene (“telomere position effect”), que por sua vez pode contribuir para o dano ou sensibilização a outros anticancerígenos (UZIEL e LAHAV, 2014).

O encurtamento do telômero é considerado uma das principais causas do envelhecimento celular (LOPEZ-OTIN *et al.*, 2013), podendo desencadear a indução da senescência ou a incapacidade permanente para continuar a proliferação (COLLADO *et al.*, 2007). Telômeros de células-tronco que perderam a integridade resultam no esgotamento da sua capacidade para auto-renovação (FLORES *et al.*, 2005). Neste estudo as células não apresentaram sinais de senescência nos tratamentos de curto prazo. Nos tratamentos de longo prazo, a linhagem MDA-MB-231 não apresentou sinais de senescência, porém a linhagem de MCF-7 apresentou sinais de senescência tanto no grupo D quanto no grupo M. Mas foi possível quantificar maior número de células senescentes no grupo M.

É possível que naturalmente a linhagem MCF-7 já possua certo percentual de células senescentes, que pode estar relacionado ao tamanho do telômero, que é menor quando comparado com a linhagem de MDA-MB-231. O tempo necessário para a inibição da telomerase desencadear seus efeitos celulares, depende do comprimento inicial dos telômeros das células alvo (ZHANG *et al.*, 1999). A

exposição ao MST-312 a longo prazo, portanto, deve ter aumentando o número de células senescentes nessa linhagem.

A senescência induzida por estresse pode estar relacionada com telômeros criticamente curtos juntamente com uma grande proporção de danos ao DNA e ao DNA telomérico, danos estes que não necessariamente estão correlacionados com o comprimento médio dos telômeros (BAR e BLASCO, 2016). Estudos em camundongos, cães e humanos demonstram que a integridade dos telômeros tem mais relação com a longevidade celular do que o tamanho médio dos telômeros (CALLADO e DUMITRIU, 2013; FICK *et al.*, 2012).

Ao contrário do que era esperado, a exposição prolongada ao inibidor fez a expressão do gene hTERT ficar aumentada no grupo M da linhagem MCF-7. Estes resultados sugerem que possivelmente o MST- 312 altera a expressão da telomerase com efeito compensatório.

A perda crítica de DNA telomérico gera instabilidade cariotípica e pode ter relação com a amplificação e/ou exclusão de segmentos cromossômicos (ARTANDI e DEPINHO, 2010; HEMANN *et al.*, 2001). Portanto, a telomerase também tem papel fundamental na manutenção da integridade do genoma, e por consequência, sua inibição pode gerar danos irreparáveis na capacidade proliferativa da célula de câncer. Nas células estudadas foi possível identificar cariótipos característicos de crise telomérica nos grupos tratados com o inibidor de telomerase. Indicando que o MST-312 pode estar alterando a integridade do DNA telomérico através da inibição da telomerase.

Erosões teloméricas foram documentadas em tumores pré-malignos através da utilização de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), o qual também revelou fusões cromossômicas *end-to-end* que sinalizam crise (HANSEL *et al.*, 2006), além de aumento de taxas de aberrações cromossômicas, acúmulo de danos no DNA, parada do ciclo celular e apoptose em tumores hepáticos telomerase deficientes (BEGUS-NAHRMANN *et al.*, 2012). A estrutura dos telômeros quando íntegras, impedem que as extremidades dos cromossomos sejam reconhecidas como quebras de cadeia de DNA, evitando a recombinação homóloga entre os telômeros, bem como fusões *end-to-end* (DELANGE, 2002).

Embora neoplasias sejam estruturas complexas e suas células possuam uma variabilidade genética considerável devido ao grande número de mutações, algumas

delas evidenciam mecanismos que facilitam mais algumas mutações/reparações que outras, promovendo genótipos mais favoráveis à proliferação e resistência. A recorrência de aberrações como ampliações e deleções em locais específicos no genoma, que aumentam a variabilidade genética em pontos específicos, indicam que esses sítios podem possuir genes que de certa forma, melhoram o desempenho proliferativo, proporcionando alguma vantagem (KORKOLA e GRAY, 2010). As mesmas mutações podem ser encontradas em diferentes tipos de câncer (ALEXANDROV *et al.*, 2013), o que indica uma provável vantagem na aquisição de determinado fenótipo produzido por mutações estratégicas. A variabilidade do *5p15.33 locus* (gene que codifica *hTERT*) contribui para a predisposição para o câncer e a presença dos polimorfismos *in locus* no *TERT* tem sido associada a um risco aumentado para várias doenças malignas (MOCELLIN *et al.*, 2012).

Foi observado inicialmente que o Tamanho Médio dos Telômeros das linhagens estudadas era maior em MDA-MB-231 do que em MCF-7. Ao longo do tratamento e nos ensaios essas duas linhagens tiveram comportamento diferente frente ao mesmo inibidor. Enquanto que as células da linhagem MDA-MB-231 apresentaram indícios de ter desenvolvido resistência, as células de MCF-7, de forma oposta demonstraram maior sensibilidade ao inibidor, e compensaram esse cenário desfavorável com maior expressão de *hTERT*.

Esses dois aspectos das linhagens levaram a duas respostas distintas. Já é descrito que a quantificação de expressão de telomerase em câncer de mama está correlacionado com o prognóstico (CLARK *et al.*, 1997; POREMBA *et al.*, 2002). Diagnósticos precisos são imprescindíveis para um tratamento eficiente (VALLE *et al.*, 2015). Correlacionar o tamanho médio dos telômeros e a expressão relativa de *hTERT* pode ser um estratégia diagnóstica que possibilite prever como um determinado tipo de câncer responderá ao tratamento com inibidores de telomerase, e também permitir correlações com o prognóstico como já foi descrito para câncer colón-retal (FERNANDEZ-MARCELO *et al.*, 2016). Mais estudos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.

O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas na telomerase representa uma possibilidade de melhorar a eficiência dos tratamentos em oncologia, com o auxílio de um fármaco capaz de promover o efeito desejado de forma específica, mesmo em diferentes tipos de tumores. Porém, nosso estudo

demonstrou que as células de câncer respondem de forma peculiar ao tratamento com o MST-312.

Os mecanismos de ação do MST-312 ainda não estão completamente elucidados, assim como as diversas funções celulares da enzima telomerase. Porém, é possível afirmar que as consequências do uso prolongado do composto têm efeitos diversos em células de câncer de mama, indicando que a dinâmica celular responde de maneira diferente quando exposta ao mesmo inibidor.

A resistência ou a sensibilidade foram demonstradas neste estudo como possibilidades de adaptação da célula quando imposta uma pressão seletiva. Em ambos os casos, é preciso esclarecer os caminhos percorridos para essa alteração fenotípica, pois foi possível identificar a atividade antitumoral, mas a seleção de células resistentes na terapia à longo prazo levanta sérias questões sobre a aplicabilidade clínica.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi determinado a IC50% do composto MST-312 para linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 telomerase positivas.

Foi constatado o efeito citotóxico dose-dependente deste composto nessas linhagens em curto prazo de 72 horas de exposição. A concentração de 2 μ M foi subtóxica para ambas as linhagens e utilizada para exposições em longo prazo de 18 semanas.

As células da linhagem MDA-MB-231, após o tratamento de 18 semanas apresentou sinais de resistência à droga, com aumento da viabilidade celular do grupo tratado com o composto. E indícios de seleção de células com telômeros maiores. Enquanto que a linhagem de MCF-7 apresentou maior sensibilidade ao composto, em concentrações mais baixas do que a utilizada no tratamento por 18 semanas, com sinais de senescência celular e cariótipos indicativos de crise telomérica.

Este estudo demonstrou que células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 telomerase positivas, reagem de forma diferente quando expostas ao inibidor de telomerase MST-312.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E.; ARITONOVSKA, E.; REICHENBACH, P.; CRISTIFARI, G.; CULP, B.; TEMS, R. M.; LINGNER, J.; TEMS, M. P. TIN2-Tethered TPP1 Recruits Human Telomerase to Telomeres In Vivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 12, p. 2971–2982, 2010. DOI: 10.1128/MCB.00240-10

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324–1337, 2007. DOI: 10.1038/sj.onc.1210220.

ALEXANDROV, L.B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D. C.; APARICIO, S. A. J. R.; BEHJATI, S.; BIANKIN, A. V.; et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, p. 415-502, agosto 2013. DOI: 10.1038/nature12477

APEL, A.; ZENTGRAF, H.; BUCHLER, M. W.; HERR, I. Autophagy—A double-edged sword in oncology, **International Journal of Cancer**, v. 125, p. 991–995, 2009. DOI: 10.1002/ijc.24500

ARTANDI, S. E.; DEPINHO, R. A. Telomeres and telomerase in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 9–18, 2010. DOI: 10.1093/carcin/bgp268

AVILION, A. A.; PIAYSZEK, M. A.; GUPTA, J.; SHAY, J. W.; BACCHETTI, S.; GREIDER, C. W. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. **Cancer Research**, V. 56, n.1, p. 645-650, 1996.

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

BEGUS-NAHRMANN, Y.; HARTMANN, D.; KRAUS, J.; ESHRAGHI, P.; SCHEFFOLD, A.; GRIEB, M.; et al. Transient telomere dysfunction induces chromosomal instability and promotes carcinogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2283-2288, 2012. DOI: 10.1172/JCI61745.

BELLON, M.; NICOT, C. Multiple Pathways Control the Reactivation of Telomerase in HTLV-I-Associated Leukemia. **International Journal Cancer Oncology**, v. 2, n. 2, p. 1-17, 2015. DOI: 10.15436/2377-0902.15.017

BRUIN, E.C.; TAYLOR, T. B.; SWANTON, C. Intra-tumor heterogeneity: lessons from microbial evolution and clinical implications. **Genome Medicine**, v. 5, n. 101, p. 1-11, 2013. DOI: 10.1186/gm505

BRYAN, T. M.; ENGLEZOU, A.; GUPTA, J.; BACCHETTI, S.; REDDEL, R. R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. **EMBO J**, n. 14, n. 17, p. 4240-4248, 1995.

BRYAN, T. M.; ENGLEZOU, A.; DALLA-POZZA, L.; DUNHAM, M. A.; REDDEL, R. R. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. **Nat. Medicine**, n. 3, p. 1271-1274, 1997.

BURCHETT, K. M.; YAN, Y.; OUELLETTE, M. M. Telomerase Inhibitor Imetelstat (GRN163L) Limits the Lifespan of Human Pancreatic Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85155, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085155

BURGE, S.; PARKINSON, G. N.; HAZEL, P.; TODD, A. K.; NEIDLE, S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 19, p. 5402-5415, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkl655

BURGER, A. M.; DAI, F.; SCHULTES, C. M.; RESZKA, A. P.; MOORE, M. J.; DOUBLE, J. A.; NEIDLE, S. The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. **Cancer Research**, v. 65, n°. 4, 2005.

CALLADO, R. T.; DUMITRIU, B. Telomere dynamics in mice and humans. v. 50, p. 165-174, 2013.

CARELS, N.; SPINASSÉ, L. B.; TILLI, T. M.; TUSZYNSKI, J. A. Toward precision medicine of breast cancer. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 13, n. 7, p. 1-46, 2016. DOI: 10.1186/s12976-016-0035-4

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. **Cancer Research**, v. 47, n. 15, p. 936-942, 1987.

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

CHAVEZ, K. J.; GARIMELLA, S. V.; LIPKOWITZ, S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. **Breast Dis.**, v. 32, p. 35–48, 2010. DOI: 10.3233/BD-2010-0307

CHENG, N.; CHYTIL, A.; SHYR, Y.; JOLY, A.; MOSES, H. L. TGF- β signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n 10, p. 1521–1533, 2008. DOI: 10.1158/1541-7786

CHOI, B. J.; YOON, J. H.; KIM, O.; CHOI, W. S.; NAM, S. W.; LEE, J. Y.; PARK, W. S. Influence of the hTERT rs2736100 polymorphism on telomere length in gastric cancer. **World Journal Gastroenterology**, v. 21, n. 31, p. 9328-9336, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i31.9328

CLARK, G. M.; OSBORNE, C. K.; LEVITT, D.; WU, F.; KIM, N. W.; Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 89, N. 24, p. 1874-1881, 1997.

COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. **Cell**, v. 130, n. 27, p. 223-233, July 27, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.003

CONG, Y.; SHAY, J. W. Actions of human telomerase beyond telomeres. **Cell Research**, v. 18, n. 7, p. 725-732, 2008. DOI: 10.1038/cr.2008.74

CREES, Z.; GIRARD, J.; RIOS, Z.; BOTTING, G. M.; HARRINGTON, K.; SHEARROW, C.; et al. Oligonucleotides and G-quadruplex Stabilizers: Targeting Telomeres and Telomerase in Cancer Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 41, p. 6422-6437, 2014.

DAI, F.; PEREZ, J.; RESZKA, A. P.; CHESSARI, G.; READ, M. A.; BURGER, A. M.; NEIDLE, S. G-quadruplex interaction of 3,6,9-trisubstituted acridines leads to specific telomerase inhibition, induction of senescence and telomere shortening. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 7, p. 90-91, 2002

DANAEI, G.; HOOM, S. V.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L.; EZZATI, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **The lancet**, v. 366, n 19, p.1784-1793 2005.

DELANGE, T. Protection of mammalian telomeres. **Oncogene**, v. 21, p. 532 – 540, 2002. DOI: 10.1038/sj/onc/1205080

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

FEIJOO, P.; DOMINGUEZ, D.; TUSSEL, L.; GENESCA, A. Telomere-Dependent Genomic Integrity: Evolution of the Fusion-Bridge-Breakage Cycle Concept. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 41, p. 6375-6385, 2014.

FERNANDEZ-MARCELO, T.; SANCHEZ-PERNAUTE, A.; PASCUA, I.; JUAN, C. D.; HEAD, J.; TORRES-GARCIA, A. J.; INIESTA, P. Clinical Relevance of Telomere Status and Telomerase Activity in Colorectal Cancer. **PlosOne**, v. 25, p. 1-12, fevereiro, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0149626

FICK, L. J.; FICK, G. H.; LI, Z.; CAO, E.; BAO, B.; HEFFELFINGER, D.; PARKER, H. G.; OSTRANDER, E. A.; RIABOWOL, K. Telomere Length Correlates with Life Span of Dog Breeds. **Cell Reports**, v. 2, n. 27, p. 1530–1536, 2012.

FILHO, V. W.; GATTAS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 467-480, 2001.

FLORES, B. I.; CAYUELA, M. L.; BLASCO, M. A. Effects of Telomerase and Telomere Length on Epidermal Stem Cell Behavior. **Science**, v. 309, p. 1253-1256, 2005.

GERLINGER, M.; ROWAN, A. J.; HORSWELL, S.; LARKIN, J.; MATH, M.; ENDESFELDER, D.; et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. **The New England Journal of Medicine**, v.366, n. 10, p. 883-892, 2012.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro Patologia Med. Lab.**, v. 48, n. 6, p. 463-474, 2012.

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

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

HANSEL, D. E.; MEEKER, A. K.; HICKS, J.; MARZO, A. M.; LILLEMOR, K. D.; SCHULICKS, R.; et al. Telomere length variation in biliary tract metaplasia, dysplasia, and carcinoma. **Modern Pathology**, v. 19, p. 772–779, 2006. DOI: 10.1038/modpathol.3800591

HEMANN, M. T.; STRONG, M. A.; HAO, L. Y.; GREIDER, C. W. The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability. **Cell**, v. 107, n. 6, p. 67–77, 2001.

HUANG, L.; PERRAULT, C.; COELHO-MARTINS, J.; HU, C.; DULONG, C.; LIU, J.; et al. Induction of acquired drug resistance in endothelial cells and its involvement in anticancer therapy. **Journal hematology oncology**, v. 6, n. 49, p. 1-11, 2013. DOI: 10.1186/1756-8722-6-49

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência à múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura- atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148-2154, 2010.

HWANG, H.; KREIG, A.; CALVERT, J.; LORMAND, J.; KWON, Y.; DALEY, J. M.; SUNG, P. Telomeric Overhang Length Determines Structural Dynamics and

Accessibility to Telomerase and ALT-Associated Proteins. **CellPress**, v. 10, p. 842–853, 2014.

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.

JLIANG, B. H.; LIU, L. Z. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. **Advances in Cancer Research**, v. 102, p. 19–65, 2009. DOI: 10.1016/S0065-230X(09)02002-8

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Ed. Guanabara Koogan, 10ª edição, 2004.

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

KORKOLA, J.; GRAY, J. W. Breast cancer genomes — form and function. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 20, n. 1, p. 4–14, 2010. DOI: 10.1016/j.gde.2009.11.005

LACEY JR, J. V.; KREIMER, A. R.; BUYS, S. S.; MARCUS, P. M.; CHANG, S. C.; LEITZMANN, M. F.; et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. **Bio Med Central Cancer**, v. 9, n. 84, p. 1-8, 2009. DOI: 10.1186/1471-2407-9-84

LEE, M.; HILLS, M.; CONOMOS, D.; STUTZ, M. D.; DAGG, R. A.; LAU, L. M. S.; et al. Telomere extension by telomerase and ALT generates variant repeats by mechanistically distinct processes. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 3, p. 1733–1746, 2014. DOI: 10.1093/nar/gkt1117

LEWIN, J.; SIU, L. L. Cancer genomics: the challenge of drug accessibility. **Current Opinion in Oncology**, v. 27, n. 3, p. 250-7, 2015.

LOGANZO, F.; TAN, X.; SUNG, M.; JIN, G.; MYERS, J. S.; MELAMUD, E.; WANG, F.; et al. Tumor cells chronically treated with a trastuzumab-maytansinoid antibody-

drug conjugate develop varied resistance mechanisms but respond to alternate treatments. **Mol Cancer Ther.** v. 14, p. 952-963, 2015.

LOPEZ-OTIN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The Hallmarks of Aging. **Cell.** v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039

MAIDA, Y.; MASUTOMI, K. Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase. **Cancer Science**, v. 106, p. 1486–1492, 2015. DOI: 10.1111/cas.12806

MASUTOMI, K.; POSSEMATO, R.; WONG, J. M.; CURRIER, J. L.; TOTHOVA, Z.; MANOLA, J. B.; et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 102, n. 23, p. 8222–8227, 2005.

MEYERSON, M.; COUNTER, C. M.; EATON, E. N.; ELLISEN, L. W.; STEINER, P.; CADDLE, S. D.; et al. hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization. **Cell**, v. 90, n. 22, p. 785–795, 1997.

MOCELLIN, S.; VERDI, D.; POOLEY, K. A.; LANDI, M. T.; EGAN, K. M.; BAIRD, D. M.; et al. Telomerase Reverse Transcriptase Locus Polymorphisms and Cancer Risk: A Field Synopsis and Meta-Analysis. **JNCI**, v. 104, n. 11, p. 840-854, junho 2012. DOI: 10.1093/jnci/djs222

O'CALLAGHAN, N. J.; FENECH, M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. **Biological Procedures Online**, v. 13, n.3, p. 1-10, 2011. DOI: 10.1186/1480-9222-13-3

OMS, **Organização Mundial da Saúde**. Acessado em 23 de abril de 2016. <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index3.html>.

OMS, **Organização Mundial da Saúde**, Perfis oncológicos de los países, 2014. Acessado em 23 de abril de 2016 http://www.who.int/cancer/country-profiles/bra_es.pdf?ua=1

PARK, J. I.; VENTEICHER, A. S.; HONG, J. Y.; CHOI, J.; JUN, S.; SHKRELI, M.; et al. Telomerase modulates Wnt signaling by association with target gene chromatin. **Nature**, v. 460, p. 66–72, 2009. DOI: 10.1038/nature08137

PEREIRA, F. A. N. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE TELOMERASE EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS INDIFERENCIADAS E EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS DE CAMUNDONGO. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2008. Acessado em 02 de abril de 2016 http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ECJS-84NHFH/francisco_de_assis_nunes_pereira.pdf?sequence=1

POREMBA, C.; HEINE, B.; DIALLO, R.; HEINECKE, A.; WAI, D.; SCHAEFER, K. L.; et al. Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. **The Journal of Pathology Society**, v. 198, n. 2, p. 181-189, outubro 2002.

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

ROMANIUK, A.; KOPCZYLSKI, P.; KSILEK, K.; RUBIL, B. Telomerase Modulation in Therapeutic Approach. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, p. 6438-6451, 2014.

SANTAMBROGIO, F.; GANDELLINI, P.; CIMINO-REALE, G.; ZAFFARONI, N.; FOLINI, 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.

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.

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

STAMPER, I. J.; BYME, H. M.; OWEN, M. R.; MAINI, P. K. Modelling the Role of Angiogenesis and Vasculogenesis in Solid Tumour Growth. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 69, p. 2737-2772, 2007.

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

VALLE, I.; BRAGAZZI, N. L.; TRAMALLONI, D. Cancer prevention: state of the art and future prospects. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 56, p. E21-E27, 2015

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LENVINE, M.; LOSICKE, R. **Biologia Molecular do Gene** – 7° edição, 2006.

WEINBERG, R. A. **A biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WHITE, E.; DIPAOLA, R. S. The Double-edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. **Clinical Cancer Research**, setembro, v. 15, n. 17, p. 5308–5316, 2009.

WYATT, H. D.; WEST, S.C.; BEATTIE, T. L. Interpreting telomerase structure and function. **Nucleic Acids Res.** v. 38, n. 17, p. 5609-22, 2010.

YATABE, N.; KYO, S.; KONDO, S.; KANAYA, T.; WANG, Z.; MAIDA, Y.; et al. 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.

ZHANG, X.; MAR, V.; ZHOU, W.; HARRINGTON, L.; ROBINSON, M. O. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. **Genes e development**, v. 13, p. 2388–2399, 1999.

ZHAO, L.; WINK, M. The β -carboline alkaloid harmine inhibits telomerase activity of MCF-7 cells by down-regulating hTERT mRNA expression accompanied by an accelerated senescent phenotype. **PeerJ**, 2013. DOI: 10.7717/peerj.174

ZHOU, G.; LIU, X.; LI, X.; XU, S.; MA, C.; WU, X.; CHENG, Y.; YU, Z.; ZHAO, G.; CHEN, Y. Telomere targeting with a novel G-quadruplex-interactive ligand BRACO-

19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells. **Oncotarget Advance Publications** 2016.