

# AValiação DA SENSIBILIZAÇÃO COM TUNICAMICINA AO TRATAMENTO COM AMSACRINA EM CÉLULAS RESISTENTES A QUIMIOTERAPIA COM INIBIDORES DE TOPOISOMERASE

Taynah Alves Soares<sup>1</sup>; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina – CCB – UFPE; E-mail: taynahsoares@gmail.com,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: moacyroraculo@gmail.com.

**Sumário:** A combinação de diferentes drogas anticâncer é uma estratégia utilizada para obtenção de resultados mais eficazes durante o tratamento, fazendo com que a dose e o desenvolvimento de resistência à terapia sejam reduzidos. Os inibidores da topoisomerase são exemplos de compostos usados na prática clínica em associação com outros fármacos. Dentre esses compostos, podemos citar a Amsacrina, o Etoposide e a Doxorubicina. Para aumentar a capacidade de ação de antineoplásicos pode-se utilizar a tunicamicina, uma droga capaz de tornar a célula mais sensível à morte por agentes antitumorais. Esse trabalho teve como objetivo avaliar se a sensibilização com tunicamicina é capaz de tornar células resistentes ao tratamento com inibidores de topoisomerase novamente sensíveis ao tratamento. Para isso, foram realizados testes de seletividade e citotoxicidade em células mononucleares do sangue periféricos saudáveis e na linhagem tumoral HL-60/MX1.

**Palavras-chave:** câncer; sensibilização; topoisomerase

## INTRODUÇÃO

Câncer é um termo usado para definir um grupo de doenças que tem como característica comum o crescimento desordenado de células anormais, que crescem ultrapassando seus limites habituais, podendo invadir órgãos e tecidos adjacentes, além de se espalhar para outras partes do corpo (INCA, 2009). Para o combate a essa neoplasia, as modalidades terapêuticas mais utilizadas são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e o transplante de medula óssea (INCA, 2010). Porém, muitas vezes, é necessária a combinação de diferentes drogas para obtenção de resultados mais eficazes. Uma estratégia utilizada para diminuir a dose dos fármacos e reduzir o desenvolvimento de resistência ao tratamento é a combinação de drogas que regulam diferentes vias de sinalização que convergem para a morte celular (CASSON et al., 2013). Entre os compostos utilizados em associação com outros fármacos estão os inibidores da topoisomerase, uma enzima envolvida na resolução de problemas na estrutura do DNA (POMMIER et al., 2010). O primeiro composto considerado como “veneno de topoisomerase II” foi a Amsacrina (KETRON et al., 2012). Outros exemplos de agentes inibidores de topoisomerasas utilizados na terapia do câncer são a doxorubicina e o etoposide, ambos impedindo a ação da TOP2 (NITISS, 2009). Apesar de sua eficácia, tanto os inibidores da topoisomerase I como os da topoisomerase II são comumente alvos dos mecanismos de resistência à quimioterapia pelas células neoplásicas (LAGE, 2008). Outra estratégia cujo emprego apresenta-se crescente no ramo das pesquisas oncológicas é a sensibilização. Nesse processo, uma droga é inicialmente utilizada para aumentar a capacidade de ação de antineoplásicos usados subsequentemente. Um exemplo desses quimiossensibilizantes é a tunicamicina, um antibiótico que inibe a N-glicosilação e, conseqüentemente, a formação de glicoproteínas (BONAVIDA, 2008), tornando a célula tumoral mais sensível à morte por agentes antitumorais (CHIU et al., 2012). Dessa forma, a combinação no uso de compostos sensibilizantes e inibidores de

topoisomerases é uma alternativa no tratamento de células resistentes a esses inibidores, fazendo com que estas se tornem novamente sensíveis à terapia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Cultivo de células:** A linhagem de leucemia promielocítica aguda resistente a quimioterápicos, HL-60/MX1, foi obtida da ATCC e mantida em estufa a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Foi utilizado meio RPMI 1640 (Gibco), com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), 10mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco).

**Obtenção das células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC):** Após aprovação do comitê de ética da UFPE, 12 mL de sangue venoso de três voluntários saudáveis foram obtidos assepticamente, em tubos contendo ACD (Becton Dickson). As células foram isoladas pelo método de Böyum (1968). Os tubos foram centrifugados a 450g por 45 minutos, após a centrifugação foi removida a interface de leucócitos à temperatura ambiente. As PBMCs foram separadas por gradiente de densidade, utilizando-se Ficoll (Ge) com densidade 1.076. A suspensão final foi ajustada à concentração final de 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> que foram submetidas as condições experimentais e ao ensaio de MTT.

**Ensaio de citotoxicidade (MTT):** As células HL-60/MX1 foram plaqueadas numa concentração de 1x10<sup>4</sup> por poço em placas de 96 poços. A linhagem neoplásica foi tratada com Tunicamicina, Amsacrina, Bisantrene, Etoposide, Doxorubicina e Camptotecina nas concentrações de 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 e 1 µM, e as PBMCs nas doses de 19, 38, 95, 190, 285, 380 ηM e 0,5, 1, 10 e 100 µM e, em seguida, foram incubadas por 72h. Após o período de incubação, 20 µL de MTT foram adicionados aos poços e as células reincubadas por mais 3h para então serem acrescentados 130 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio). No dia seguinte, absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 550 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de seletividade em PBMCs, a Tunicamicina revelou potencial seletivo mantendo uma porcentagem de células viáveis superior a 90% em todas as concentrações testadas nos ensaios – que variaram entre 0,019 e 1 µM. Para os testes de seletividade com inibidores de topoisomerase, as concentrações utilizadas variaram entre 10 e 50 µM nos ensaios com Etoposide, Bisantrene, Doxorubicina e Camptotecina; e entre 1 a 50 µM nos experimentos com Amsacrina. O resultado dos primeiros mostrou que eles não exerceram ação citotóxica nas duas doses experimentadas. Por outro lado, a Amsacrina mostrou-se não tóxica apenas na dose de 1 µM, nas demais concentrações a porcentagem de células do sangue periférico viáveis pouco ultrapassou os 40%.

Nos ensaios de citotoxicidade com Tunicamicina foram experimentadas as doses de 0,025; 0,05; 0,1; 0,5 e 1 µM. Com exceção da dose de 0,025 µM, todas as concentrações revelaram-se citotóxicas. O efeito dose resposta foi perceptível (Figura 2A); 0,04 µM foi a concentração apontada pelo cálculo do IC<sub>50</sub> deste composto em HL60/MX1.

Entre os inibidores de topoisomerase, testados nas doses de 0,1; 0,5 e 1 µM, a Camptotecina foi o que apresentou maior inibição da sobrevivência celular nos testes com a linhagem de leucemia aguda (Figura 2B). A média de viabilidade ficou próxima dos 3% em todas as concentrações experimentadas. A Doxorubicina, por sua vez, foi o segundo mais tóxico. As taxas de viabilidade celular ficaram entre 73 e 35%. Desse modo, foi possível o cálculo do IC<sub>50</sub> deste composto em HL60/MX1 (0,58 µM).

O cálculo do IC<sub>50</sub> foi aplicável também nos resultados de morte celular causada pela Amsacrina. A concentração de 0,69 µM deste composto é capaz de atingir uma taxa de células viáveis (*in vitro*) de 50% na linhagem HL60/MX1. Etoposide e Bisantrene

foram os que se mostraram menos tóxicos, apresentado taxas de viabilidade celular superior aos 70% em todas as concentrações estabelecidas nos testes com essa linhagem.



**A** Figura 2 – Teste de citotoxicidade em HL60/MX1; **A** – Tunicamicina; **B** – Etoposide, Bisantrene, Doxorubicina, Camptotecina, Amsacrina.

Até o presente momento apenas um ensaio de sensibilização foi realizado e este sugere que tunicamicina não é capaz de reverter a resistência aos inibidores de topoisomerase. Contudo, como os resultados são incipientes e sua reprodutibilidade precisa ser testada.

## CONCLUSÕES

Em PBMCs, a tunicamicina mostrou ser seletiva e manteve uma viabilidade celular superior a 90%, enquanto entre os inibidores de topoisomerase, a Amsacrina foi o único composto que exerceu ação citotóxica. Nos ensaios de citotoxicidade na linhagem HL-60/MX1, a tunicamicina revelou-se tóxica em quatro das doses testadas, apresentando um IC50 de 0,04 µM. Dos inibidores da topoisomerase, a Camptotecina foi o que apresentou maior inibição da sobrevivência celular, seguida pela Doxorubicina. No entanto, torna-se necessária a realização de testes com a tunicamicina em associação aos compostos que não apresentaram toxicidade na HL-60/MX1 para avaliar se a tunicamicina é capaz de tornar essas células novamente sensíveis ao tratamento.

## AGRADECIMENTOS

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT).

## REFERÊNCIAS

- Bonavida, B. 2008. *Sensitization of Cancer Cells for Chemo/Immuno/Radio-therapy*. Humana Press. Los Angeles.
- Casson, L., Howell, L., Mathews, L. A., Ferrer, M., Southall, N., Guha, R., Keller, J. M., Thomas, C., Siskind, L. J., Beverly, L. J. 2013. Inhibition of Ceramide Metabolism Sensitizes Human Leukemia Cells to Inhibition of BCL2-Like Proteins. *PLoS One*. 8: e54525.
- Chiu, S. C., Chen, S. P., Huang, S. Y., Wang, M. J., Lin, S. Z., Harn, H. J., Pang, C. Y. 2012. Induction of Apoptosis Coupled to Endoplasmic Reticulum Stress in Human Prostate Cancer Cells by *n*-butylidenephthalide. *PLoS ONE*. 7: e33742.
- Instituto Nacional do Câncer. *O que é câncer*. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 15 ago. 2015.
- Instituto Nacional do Câncer. *Tratamento do câncer*. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

Ketron, A. C., Denny, W. A., Graves, D. E., Osheroff, N. 2012. Amsacrine as a Topoisomerase II poison: Importance of drug-DNA interactions. *Biochemistry*, 51: 1730-1739.

Lage, H., 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 3145-3167.

Nitiss, J. L. 2009. Targeting DNA Topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 9: 338-350.

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C. 2010. DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology*. 17: 421-33.