ONCOCLIL
II Congresso Brasileiro On-line de Oncologia Clínico-Laboratorial

CARACTERIZAÇÃO DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES NO CANCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO EM MODELO TRIDIMENSIONAL *IN VITRO*

BÁRBARA AVELAR FERREIRA BARROS; MILENE PEREIRA MOREIRA; FÁBIO RIBEIRO QUEIROZ; LUCIANA MARIA SILVA

RESUMO

O câncer de mama triplo negativo (TNBC) é responsável por 10-20% de todos os diagnósticos de câncer de mama em todo o mundo. É considerado mais agressivo do que outras formas de tumores invasivos da mama devido ao seu fenótipo ER-/PR-/HER2-, que oferece aos pacientes poucas alternativas de tratamento além da quimioterapia e mau prognóstico. As células-tronco do câncer (CSCs) são uma pequena subpopulação do Microambiente Tumoral (TME), envolvida na diferenciação, migração, autorrenovação e proliferação. São resistentes à quimioterapia e tendem a se expandir após o tratamento, levando à recorrência, metástase e a um fenótipo tumoral mais agressivo. O objetivo desse projeto é compreender os mecanismos pelos quais as CSCs regulam processos biológicos e causam quimiorresistência por meio do cultivo das linhagens de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231, BT-549 e Hs 578T em cultura tridimensional para a formação de esferóides tumorais enriquecidos com CSC, para análise da expressão gênica de diferentes vias de sinalização por qPCR, morfologia por Microscopia Confocal à Laser e análise de Vesículas Extracelulares (VEs) por Zetasizer. Expressão gênica por RT-qPCR com alvos relacionados à pluripotência e desenvolvimento tumoral foi realizado em esferoides de BT-549, MDA-MB231 e Hs 578T tratados com Doxorrubicina (DOX) e apontam que o tratamento quimioterápico à base de doxorrubicina demonstra capacidade de aumentar a progressão tumoral *in vitro*, regulando positivamente genes relacionados à proliferação celular e manutenção da pluripotência. A análise estrutural mostra a organização ordenada das células, a tendência das CSCs de se agrupar nas regiões internas dos esferóides e abundância de vesículas intracelulares. Avaliação de vesículas presentes no sobrenadante dos esferoides de MDA-MB-231 controle e tratados com DOX indicam a liberação de quantidade significativamente superior de microvesículas em relação a exossomos pelas células tumorais, que podem atuar como meio de comunicação extracelular e modulação dentro do microambiente tumoral. Os resultados obtidos até o momento demonstram a extrema importância das CSCs pluripotentes no controle e progressão do tumor, o que torna imprescindível o entendimento dos mecanismos de sua atuação no microambiente tumoral para aprimoramento dos tratamentos já existentes e desenvolvimento de terapias alternativas para essa neoplasia.

Palavras-chave: Pluripotência; Células-tronco do câncer; Câncer de mama triplo-negativo; Quimiorresistência; Vesículas extracelulares.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama foi líder em número de novos casos (11,7%) e o quinto maior

DOI: 10.51161/oncoclil2023/26872

causador de mortes (6,9%) dentre as neoplasias segundo dados mais recentes divulgados pela Organização Mundial da Saúde (GLOBOCAN, 2020.) Doença multifatorial causada por aspectos genéticos, endócrinos, ambientais, reprodutivos e idade avançada, esse tumor é subclassificado em quatro categorias de acordo com sua expressão imuno-histoquímica de receptores de hormônios: o positivo para receptores de estrogênio (ER+), positivo para receptores de progesterona (PR+), positivo para receptores do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2+) e o negativo para os três tipos de receptores, conhecido como triplo-negativo (TNBC). A expressão desses receptores é utilizada como alvo de terapias alternativas e marcadores de diagnóstico e prognóstico, além de estarem relacionados à maior sobrevida e menor taxa de recorrência (ORRANTIA-BORUNDA. *et al.* 2022), o que torna o câncer de mama triplo-negativo um subtipo mais agressivo da doença, apresentando prognóstico desfavorável, maior taxa de recorrência e mortalidade e poucas opções de tratamento: quimioterapia à base de fármacos como a Doxorrubicina (DOX) e radioterapia. Dificultando ainda mais seu tratamento, o câncer de mama triplo-negativo também é um tumor altamente heterogêneo, podendo ser classificado de acordo com suas características transcriptômicas como basal (BL), imunomodulatório (IM), mesenquimal (M+) e receptor luminal de andrógeno (LAR), o subtipo mesenquimal apresentando maiores características de células-tronco e pluripotência (YIN, L. *et al.* 2020).

Pluripotência é a capacidade de algumas células-tronco de autorrenovação, se dividindo em uma exata cópia de si mesmo, e diferenciação, dando origem à outra célula capaz de se diferenciar em qualquer uma das três linhagens embrionárias: ectoderma, endoderma e mesoderma e, por consequência, qualquer tipo celular adulto. Dessa forma, células-tronco do câncer (CSCs) pluripotentes são capazes de manter sua própria população de células-tronco e ao mesmo tempo criar e manter outras subpopulações celulares dentro do microambiente tumoral (TME) de acordo com estímulos recebidos pelo nicho em que residem. CSCs também possuem a habilidade de sair do ciclo celular enquanto mantém sua capacidade de divisão (URBÁN, N.; CHEUNG, T. H. *et al*. 2021), um estado chamado de quiescência, que quando ativado, torna sua cromatina menos acessível e dificulta a morte desse tipo celular por tratamentos convencionais, que tem como alvo o DNA das células tumorais. Essas características tornam a subpopulação de CSCs mais resistentes e as permite controlar processos biológicos importantes no microambiente tumoral, como metástase, tumorigênese, proliferação celular, recorrência e quimiorresistência.

Tendo em vista a agressividade do tumor triplo-negativo, carência de tratamentos alternativos e sua alta taxa de recorrência e mortalidade, o objetivo desse projeto é compreender os mecanismos pelos quais as CSCs regulam processos biológicos e causam quimiorresistência por meio do cultivo tridimensional de esferóides de linhagens de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231, BT-549 e Hs 578T enriquecidos de células-tronco do câncer.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para execução desse projeto, as linhagens de câncer de mama triplo-negativo Hs 578T (ATCC, cat. #HTB-126), MDA-MB-231 (ATCC, cat. #CRM-HTB-26) e BT-549 (ATCC, cat. #HTB-122), foram cultivadas em monocamada, ressuspendidas e plaqueadas em placas de suspensão de 96 poços (CORNING, cat. #3370) em meio específico para formação de esferóides enriquecidos em células-tronco do câncer (patente BR1020220111553), que foram então utilizados para os experimentos listados neste trabalho.

Foram realizados ensaios de RT-qPCR em esferóides controle e tratados com o quimioterápico Doxorrubicina (Sigma-Aldrich, cat. #D1515) das linhagens de triplo-negativoBT-549, MDA-MB-231 e Hs 578T, utilizando primers para os alvos *POU5F1/OCT4, KLF4, c- MYC, SOX2, SOX4, NANOG, AKT1, AKT2, AKT3* e *CDH1*.

DOI: 10.51161/oncoclil2023/26872

A análise morfológica foi feita através de Microscopia à Laser Confocal em esferoides de Hs 578T e células de MDA-MB-231 cultivadas em monocamada. Nos ensaios com esferoides de Hs 578T, foram marcados núcleo e membrana celular (Image-IT™ LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling Kit Invitrogen, cat. #I34406), lisossomos (LysoTracker™ Red DND-99, Invitrogen, cat. #L7528) e células-tronco do câncer (CD44, BD Biosciences, cat. #560532). Para visualização de células de MDA-MB-231 em monocamada, foram marcados filamentos de actina (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin, Invitrogen, cat. #A12379), núcleo (DAPI, Invitrogen, cat. #D1303), lisossomos (LysoTracker™ Red DND-99, Invitrogen, cat. #L7528) e células-tronco do câncer (CD44, BD Biosciences, cat. #560532).

A avaliação de vesículas extracelulares foi feita por coleta de sobrenadante de esferoides de MDA-MB-231 controle e tratados com doxorrubicina (Sigma-Aldrich, cat. #D1515) analisados no Zetasizer Nano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alvos relacionados às vias de pluripotência e desenvolvimento tumoral foram escolhidos e avaliados a partir de seus níveis de interações proteicas por meio do software STRING e sua expressão gênica calculada por $2^{-\Delta\Delta\mathbf{CT}}$. Os resultados de RT-qPCR em esferoides das três linhagens tratados com Doxorrubicina são demonstrados na Figura 1A.

Esferóides da linhagem BT-549 apresentaram regulação positiva da expressão de genes como *POU5F1/OCT4*, extremamente importante na manutenção da pluripotência, e *AKT1* e *AKT3*, reguladores da via WNT e responsáveis por aumento da proliferação celular e formação de esferoides e *CDH1*, relacionado à transição epitelial-mesenquimal, enquanto o *KLF4*, um gene supressor tumoral e proteína imprescindível na regulação epigenética da pluripotência em tumorigenese foi regulado negativamente, juntamente com outro fator de Yamanaka, *MYC*. Todos os genes expressos na linhagem MDA-MB-231 se mostraram regulados negativamente após tratamento: além do *AKT1, AKT3, MYC* e *POU5F1*, o gene de pluripotência *SOX4* também foi subexpresso. Já em esferoides de Hs 578T, *POU5F1, AKT1* e *MYC* foram regulados negativamente, enquanto *AKT3* e *NANOG*, um fator de pluripotência e gene responsável por perda de função da proteína P53 foram regulados positivamente. *MYC* foi o único gene a apresentar o mesmo padrão de expressão nas três linhagens testadas, o que pode estar relacionada ao fato de que os processos regulados por esse fator, como proliferação celular, diferenciação, reparo de DNA e apoptose exigem uma grande quantidade de ATP que não está disponível no ambiente hipóxico e hipoglicêmico pós quimioterapia, e sua regulação negativa é uma forma encontrada por células tumorais para evasão de morte celular (WANG, C. *et al*. 2021). Os alvos *SOX2* e *AKT2* não foram expressos em nenhuma das linhagens testadas.

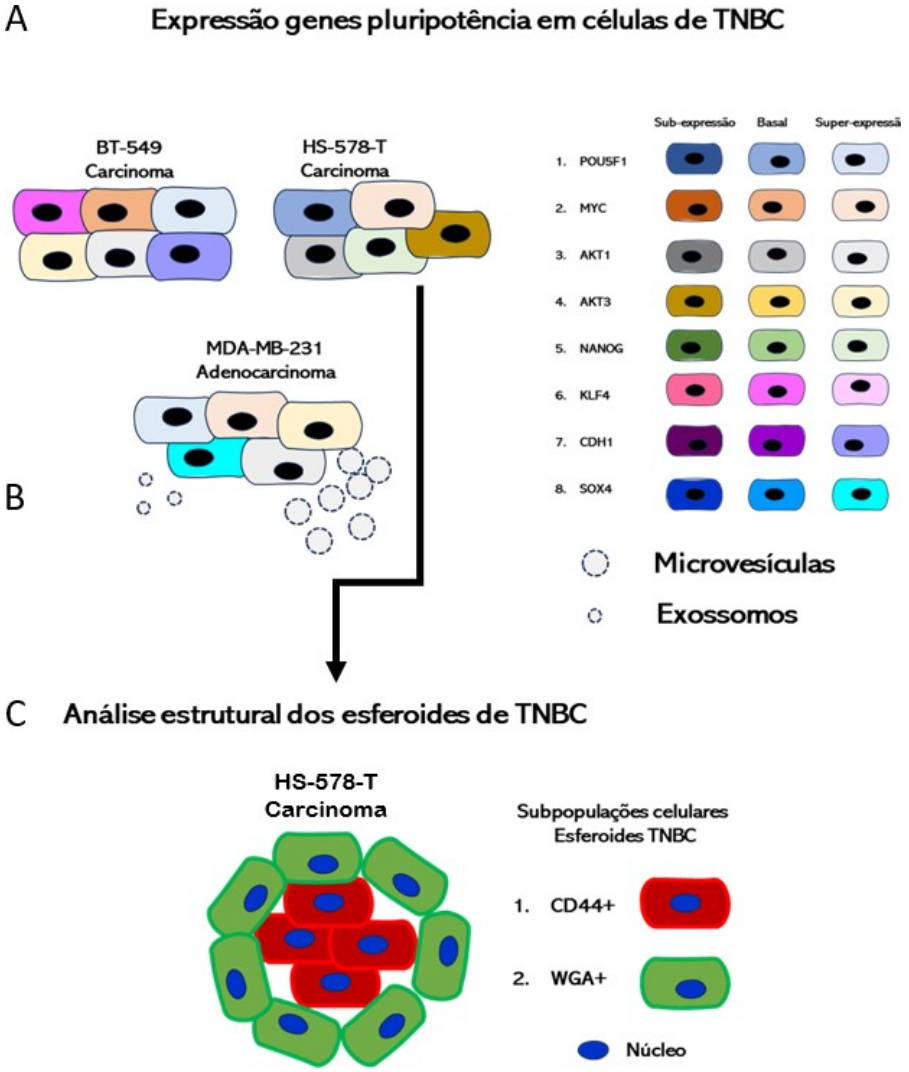
O sobrenadante de esferoides de MDA-MB-231 controle e tratados com Doxorrubicina foram coletados de uma placa de 96 poços para análise de particulas liberadas pelas células, que foi então analisado no Zetasizer Nano para maior entendimento da comunicação extracelular exercida dentro do microambiente tumoral (Figura 1B). A investigação revelou a liberação de cerca de 63% de microvesículas (150-1300nm) e 20% de exossomos (30-150nm) no sobrenadante, independentemente do tratamento recebido, e o potencial de carga dessas micropartículas revelou maior agregamento das mesmas após tratamento com Doxorrubicina.

A análise morfológica das células foi feita através de Microscopia Laser Confocal, (Figura 1C). Células em verde marcadas com WGA, lectinas que se ligam a ácido siálico e N-acetilglicosamina, demonstrando o perfil de glicosilação celular epitelial dos esferoides, uma vez que células epiteliais apresentam grande quantidade de glicanos que terminam em resíduos de galactose, N-acetilgalactosamina ou N-acetiglicosamina (GONÇALVES, B. O. P., 2019), e em vermelho células marcadas com CD44, representando as CSCs. Análise da monocamada de MDA-MB-231 indica tendência de agrupamento de células-tronco do câncer, CD44+, que

DOI: 10.51161/oncoclil2023/26872

não foi visto em células CD44-, além de alta quantidade de vesículas intracelulares em CSCs quando em comparação à outras subpopulações. Esferoides de Hs 578T (Figura 1C) demonstraram estrutura celular extremamente bem-organizada. Células CD44+ são mostradas englobando e possivelmente incorporando um agrupado de vesículas extracelulares liberadas no microambiente tumoral em um esferóide seccionado em partes através de Z-stack, indicando possíveis formas de comunicação celular e manutenção de pluripotência, e uma visão 2.5D demonstra que CSCs se agrupam em partes internas e, por consequência, áreas mais hipóxicas e agressivas dos esferóides.

Figura 1: Resumo gráfico dos resultados obtidos. A: expressão gênica dos alvos de pluripotência em esferóides das 3 linhagens tratados com doxorrubicina demonstrando a heterogeneidade do tumor; B: liberação de microvesículas (63%) e exossomos (20%) em esferóides de MDA-MB-231 controle e tratados com doxorrubicina. C: organização morfológica de esferóides de Hs 578T, células em verde marcadas com WGA para glicoproteínas de membrana, e em vermelho marcadas com CD44 para CSCs.



4 CONCLUSÃO

As respostas variadas que todas as três linhagens de TNBC exibiram aos ensaios de expressão gênica atestam à heterogeneidade do tumor e demonstram como diferentes vias podem ser ativadas para garantir a sobrevivência celular, com ativação principal das vias Notch

DOI: 10.51161/oncoclil2023/26872

e WNT, dependendo da linhagem testada, o que poderia ser explicado pelos diferentes subtipos existentes de TNBC.

Embora alguns genes apresentem regulação negativa, o tratamento quimioterápico à base de doxorrubicina demonstra capacidade de aumentar a progressão tumoral *in vitro*, regulando positivamente genes relacionados à proliferação celular, perpetuação da pluripotência e comprometimento da P53, proteína de extrema importância na regulação do ciclo celular e apoptose.

A análise estrutural mostra a organização ordenada das células, a tendência de CSCs de se agrupar nas regiões internas dos esferóides e sua grande quantidade de vesículas intracelulares, que podem atuar como meio de comunicação extracelular e modulação dentro do microambiente tumoral.

Os resultados obtidos até o momento demonstram a extrema importância das CSCs pluripotentes no controle e progressão tumoral, o que torna imprescindível o entendimento dos mecanismos de sua atuação no microambiente tumoral para melhoramento dos tratamentos já existentes e desenvolvimento de terapias alternativas para essa neoplasia.

REFERÊNCIAS

GLOBOCAN. Cancer incidence and mortality statistics worldwide and by region. **Global Cancer Observatory**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>.

GONÇALVES, B. O. P, Análise da heterogeneidade celular e participação do fenômeno de transição epitéliomesenquimal (EMT) na carcinogênese e quimioresistência de células de glioblastoma e neuroblastoma. Dissertação de mestrado, Programa de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 144p, 2019.

MOREIRA, M. P. *et al.* Spheroid-enriched model of cancer stem cells (CSCs -CD44+/CD24-/CD146-) and CD44-/CD24-/CD146- tumor cells obtained from triple-negative breast cancer cells line as an in vitro model for studies of drug targets and new therapeutic targets. Depositors. FUNED, UFMG. BR 10 2022 011155 3. Deposit: July 6, 2022.

ORRANTIA-BORUNDA, Erasmo; ANCHONDO-NUÑEZ, Patricia; LUCERO EVELIA ACUÑA-AGUILAR; *et al*. Subtypes of Breast Cancer. **Exon Publications eBooks**, p. 31–42, 2022.

URBÁN, N.; CHEUNG, T. H. Stem cell quiescence: the challenging path to activation. **Development**, v. 148, n. 3, 2021.

WANG, C.; ZHANG, J.; YIN, J.; *et al*. Alternative approaches to target Myc for cancer treatment. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 2021.

YIN, L.; JIANG, D.; XIU, W. B.; *et al*. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, 2020.

DOI: 10.51161/oncoclil2023/26872