

Fábio Luís Santos Almeida Teles

Cancer Stem Cells e a inclusão de nanopartículas nas terapêuticas anti tumorais

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Fábio Luís Santos Almeida Teles, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009224, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

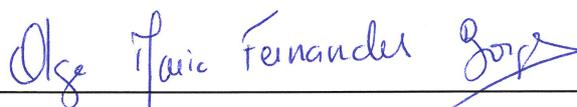
Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 18 de julho de 2014

Assinatura:

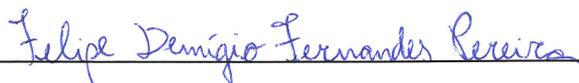
(Fábio Luís Santos Almeida Teles)

A Tutora



(Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro)

Estudante



(Felipe Demício Fernandes Pereira)

Índice

Listas de Acrónimos.....	2
Resumo	3
Abstract	3
Introdução.....	4
Cancer stem cells.....	5
<i>Cancer stem cells</i> : breve descrição.....	5
A importância das CSC no desenvolvimento tumoral.....	5
Biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos.....	7
Resistência a Terapêuticas Convencionais.....	9
<i>Utilização de nanopartículas nas terapêuticas contra Cancer Stem Cells</i>	11
Terapêutica com recurso a hipertermia mediada por nanopartículas.....	11
Vectorização contra biomarcadores.....	14
Conclusão.....	16
Referências Bibliográficas.....	18

Listas de Acrônimos

ALDH I - Aldeído desidrogenase I

CSC - *Cancer Stem Cells*

EMT - *Epithelial-Mesenchymal Transition*

FACS - *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

HIF-2 α - *Hypoxia-Inducible Factor*

NMH - Hipertermia Mediada por Nanopartículas (do Inglês *Nanoparticle-mediated hyperthermia*)

HSC - Células Estaminais Hematopoiéticas (do Inglês *Hematopoietic Stem Cells*)

HSP 90 - *Heat Shock Protein 90*

IGSs - γ -secretase

LSC - Células Estaminais de Leucemia (do Inglês *Leukemia Stem Cells*)

MGMT - *O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*

MR - Ressonância Magnética (do Inglês *Magnetic Resonance*)

NIR - *Near-Infrared*

PET - *Posítron Emission Tomography*

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (do Inglês *Reactive Oxygen Species*)

Transportadores ABC - *Transportadores ATP-binding cassette*

Resumo

Os últimos avanços na área do cancro mostram a existência de *Cancer Stem Cells* (CSC) em diversos tumores sólidos e casos de leucemia. Pensa-se que estas são responsáveis pela iniciação e progressão tumoral, assim como pelo aparecimento de metástases, recidivas e pela resistência a terapêuticas anti tumorais.

O crescente conhecimento das características destas células e a crescente evolução no desenvolvimento de nanopartículas tem permitido que surjam novas terapêuticas capazes de suprimir as CSC e assim eliminar o tumor com uma maior taxa de sucesso.

Nesta monografia serão descritas as características das CSC e o seu papel nas diversas etapas do desenvolvimento tumoral, assim como transmitir o estado atual das terapêuticas com nanopartículas vetorizadas para as CSC.

Palavras-chave: Cancer Stem Cells; Biomarcadores; Resistência a quimioterapia e radioterapia; Nanopartículas.

Abstract

The latest advances in the field of cancer show the existence of Cancer Stem Cells (CSC) in many solid tumors and leukemia. They are thought to be responsible for tumor initiation and progression, as the occurrence of metastasis, recurrence and resistance to cancer therapies.

The increasing knowledge of the CSC' characteristics and growing trend in the development of nanoparticles has increased the promises of the former to eliminate CSC and thus eliminate the tumor with better success rate.

In this monograph I highlighted the characteristics of CSC and their role in the many stages of tumor development, however the main focus of this work was bring the current state of nanoparticles for CSC therapy.

Keywords: Cancer Stem Cells; Biomarkers; Resistance to chemotherapy and radiotherapy; Nanoparticles

Introdução

O cancro é uma das maiores fontes de preocupação da população mundial e um dos grandes focos de estudo dos diversos investigadores cujo trabalho incide na área da saúde. Nas últimas décadas, apesar de ter sido feito um progresso significativo na terapêutica anti tumoral, continua a ser comum a morte de doentes devido a recidivas do tumor. (1)

A hipótese da existência de *cancer stem cells* (CSC) propõe que apenas uma pequena quantidade de células cancerígenas têm a capacidade de se auto renovar e iniciar a propagação do tumor. As CSC possuem marcadores de superfície e vias que sustentam o processo de auto renovação semelhantes aos apresentados pelas células estaminais ditas normais, acrescentando uma potente capacidade de diferenciação e de resistência a quimioterapia e radioterapia. (1) Devido a estas características, pensa-se que estas células são as responsáveis não só pela propagação do tumor como também do aparecimento de metástases e recidivas da doença. (2)

As terapêuticas anti tumorais convencionais eliminam rapidamente células que constituem o *bulk* tumoral, no entanto não conseguem ser tão efetivas contra as CSC. A resistência destas células deve-se ao seu elevado poder de auto renovação, à sua capacidade de efluxo de fármacos, capacidade anti apoptótica, assim como a outros mecanismos ainda desconhecidos. (1) Algumas vias de sinalização estão também envolvidas neste mecanismo de resistência, como exemplo poder-se-ão referir *Wnt/ β -catenin*, *Notch* e *hedgehog*. (3)

O primeiro relatório de CSC em tumores sólidos data de 2003, onde Al-Hajj demonstrou a presença destas células no cancro da mama. Desde então que as CSC têm vindo a ser identificadas num largo espectro de tumores sólidos, tal como em casos de leucemia. (2)

As nanopartículas para uso em terapêuticas anti tumorais têm evoluído a um ritmo acelerado, podendo assim oferecer um método inovador para contornar as resistências à terapêutica apresentadas pelas CSC. Recentemente, estratégias baseadas no uso de nanopartículas têm apresentado um aumento da eficácia terapêutica e uma redução dos efeitos adversos quando comparadas com as terapias convencionais. (3)

As nanopartículas, quando desenvolvidas de forma adequada, têm a capacidade de se acumular significativamente nos tecidos tumorais devido à sua habilidade para atravessar os vasos fenestrados do tumor. (3) Ao longo desta monografia pretende-se ilustrar o atual ponto de situação da investigação sobre CSC e como a eliminação destas poder-se-á tornar fulcral na obtenção de uma terapêutica eficaz contra o cancro.

Cancer stem cells

Cancer stem cells: breve descrição

As CSC são uma fração específica de células capazes de sustentar o crescimento e a progressão de um tumor. (4) Estas são definidas por uma série de características funcionais que as tornam um elemento chave no desenvolvimento de um tumor. Estas células possuem a capacidade de auto renovação ilimitada, gerando cópias de si mesmas e são capazes de gerar as restantes células que constituem a massa tumoral. Algumas CSC têm a aptidão de transitar, durante o seu ciclo de vida, entre um estado de quiescência ou “*slow-cycling*” e um estado ativo com alguma facilidade, conferindo-lhe resistência a algumas terapêuticas convencionais. De salientar que as CSC são geneticamente instáveis. (4)

A importância das CSC no desenvolvimento tumoral

Antes de referenciar a sua função no desenvolvimento tumoral, torna-se importante diferenciar entre *cancer stem cells* e *cell of origin* pois, embora os seus conceitos sejam muitas vezes confundidos, estas tratam-se de entidades diferentes. As primeiras relacionam-se com a propagação do tumor numa fase inicial e por conseguinte no seu desenvolvimento e subsistência durante os diversos estágios da doença. A segunda corresponde à célula inicial que sofreu um estímulo, levando a mutações genéticas que a tornaram numa célula cancerígena, não sendo, no entanto, necessário que esta adquira no imediato o fenótipo de uma CSC. (4)

Atualmente existem dois modelos capazes de explicar as diferentes etapas no crescimento tumoral, assim como a grande heterogeneidade de células presente neste. O modelo clássico ou *cancer stem cell model* refere que todas as etapas no desenvolvimento tumoral dependem num primeiro momento de uma pequena população de CSC. A heterogeneidade e hierarquia entre as células presentes no tumor resultam de uma divisão assimétrica das CSC que tanto origina um clone da própria, como uma célula diferenciada que constituirá a massa tumoral. Em suma, este modelo sugere que um tumor prolifera a partir de uma única população de CSC. (2)

O segundo modelo apresenta uma visão mais dinâmica, *clonal evolution model*, onde se defende a existência de diferentes populações de CSC, resultado de alterações genéticas

e/ou epigenéticas durante o desenvolvimento do tumor. Este modelo apresenta três pressupostos:

- Por definição os tumores são entidades geneticamente instáveis, portanto a evolução da sua composição celular durante os vários estádios de desenvolvimento pode, por si só, despoletar alterações genéticas e por conseguinte dar origem a uma heterogeneidade. Os dados existentes sugerem que, numa etapa inicial, o crescimento tumoral se gera a partir de um clone ou de muito poucos clones de CSC, sendo que, com a progressão da doença novos clones de CSC surgem a partir de outros já existentes ou de células diferenciadas descendentes via reprogramação parcial mediada por mutação. Logo, após erradicação da maioria das células tumorais, resultado de uma dada terapêutica instaurada, poderá ocorrer a sobrevivência de uma ou mais populações de CSC, conduzindo a uma recidiva da doença com um novo fenótipo celular;
- Em segundo lugar, as várias populações de CSC, geneticamente diferentes, podem competir entre si, levando a uma seleção de uma população mais adaptada, mais capaz, que numa etapa mais avançada do desenvolvimento do tumor terá a sua descendência na base da constituição da massa tumoral;
- Por último, os biomarcadores das CSC podem ser instáveis e como tal, ao serem reportados num determinado estádio num dado tumor, essa informação poderá só ser relevante nesse caso, não podendo haver uma ligação com outras situações semelhantes sem análise prévia. (4) (2)

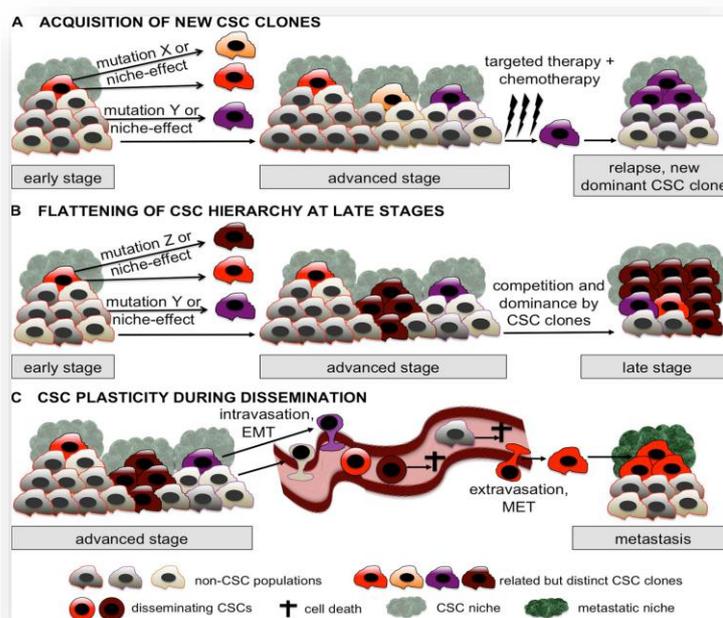


Figura 1: Clonal evolution model (adaptado de (4))

Alguns clones de CSC podem ser responsáveis pelo início do processo de metastização. De momento existem várias linhas de evidência que indicam que as células iniciadoras de metástases podem ser encontradas em subpopulações de CSC. Em primeiro lugar, as CSC possuem *tumor-initiating capacity*, que é um requisito obrigatório para estabelecer tumores secundários em órgãos distantes e, em segundo lugar, estas expressam marcadores EMT (*epithelial-mesenchymal transition*), o que sugere que têm capacidade para migrar.

Biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos

À medida que o conhecimento sobre a importância das CSC no crescimento e desenvolvimento do tumor aumenta, torna-se fulcral procurar identificar quais são os marcadores passíveis de distingui-las das demais células e que possam constituir alvos terapêuticos promissores, evitando causar danos colaterais nos tecidos saudáveis.

Atualmente, o método mais comum para a identificação de marcadores de superfície ou moléculas intracelulares destas células é *fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Um dos exemplos melhor estudados até agora é o caso das células estaminais presentes em casos de leucemia (LSC), que possuem um fenótipo muito característico, $CD34^+ CD38^-$. A perda da molécula de superfície CD38 possibilita a distinção entre as LSC e células estaminais hematopoiéticas (HSC) normais, visto que ambas são constituídas pela molécula CD34. Subsequentemente, foram descobertos marcadores de superfície das LSC mais seletivos, mais completos, como é o caso particular da combinação $CD34^+ CD38^- HLA-DR^- CD71^- CD90^- CD117^- CD123^+$, presente apenas neste tipo de células. (2)

No que concerne a tumores sólidos, Al-Hajj *et al* identificaram células $ESA^+ CD44^+ CD24^{low} Lineage^-$ como CSC de tumor mamário, constatando que estas detinham uma grande capacidade para a formação do tumor em murganhos com o sistema imune comprometido. (2)

Adicionalmente, Singh *et al* descobriram que ao transplantar uma pequena quantidade de CSC $CD133^+$ de um tumor cerebral poderiam originar tumores em murganhos com o sistema imune comprometido, sugerindo que este poderá ser um importante biomarcador. Apesar de ter sido feito um grande progresso a nível da identificação de moléculas de superfície das CSC, ainda muito continua por descobrir. Nem todas as CSC expressam os marcadores já conhecidos enquanto algumas das restantes células tumorais podem expressá-los, dificultando o isolamento das primeiras. A tabela seguinte sumariza alguns marcadores de CSC. (2) (5)

Tabela 1: Marcadores de superfície celular de CSC (adaptado de (2))

Tumor type	Phenotype of CSCs markers
Leukemia	CD34 ⁺ CD38 ⁻ HLA-DR ⁻ CD71 ⁻ CD90 ⁻ CD117 ⁻ CD123 ⁺
Breast cancer	ESA ⁺ CD44 ⁺ CD24 ^{-/low} Lineage ⁻ , ALDH-1 ^{high}
Liver cancer	CD133 ⁺ , CD49f ⁺ , CD90 ⁺
Brain cancer	CD133 ⁺ , BCRP1 ⁺ , A2B5 ⁺ , SSEA-1 ⁺
Lung cancer	CD133 ⁺ , ABCG2 ^{high}
Colon cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD166 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD24 ⁺
Multiple myeloma	CD138 ⁻
Prostate cancer	CD44 ⁺ , α 2 β 1 ^{high} , CD133 ⁺
Pancreatic	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD24 ⁺
Melanoma	CD20 ⁺
Head and neck cancer	CD44 ⁺

As CSC, assim como as células estaminais normais, parecem expressar altos níveis de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC), que são transportadores de membrana capazes de bombear para o meio extracelular pequenas moléculas estranhas a esta, como fármacos citotóxicos e corantes utilizados na terapêutica e identificação de CSC, respetivamente. (2)

Estes transportadores ABC podem contribuir para a resistência das CSC a terapêuticas anti tumorais existentes no momento. A pesquisa destas moléculas em CSC pode ser realizada recorrendo ao tratamento destas com corante *Hoechst 33342*, visto que raras são as células onde estes transportadores sejam capazes de expulsar este corante. (2)

Outro possível alvo terapêutico são as vias principais de sinalização que são de uma extrema importância no funcionamento das CSC, permitindo que estas mantenham as suas propriedades intactas. Como exemplo de vias de sinalização e elementos que se encontram envolvidos no controlo de auto renovação e diferenciação de CSC temos *PI3K/ Akt*, *PTEN*, *JAK/STAT*, *Wnt/ β -catenin*, *hedgehog*, *Notch*, *NF- κ B* e *Bcl-2*. (2) A identificação e compreensão de todos os elementos supra mencionados permitirá vetorizar e melhorar as terapêuticas anti tumorais.

Resistência a Terapêuticas Convencionais

As terapêuticas anti tumorais convencionais têm a capacidade de eliminar com alguma rapidez as células que constituem o tumor, exceto as CSC. Estas últimas apresentam uma grande resistência quer a tratamentos de quimioterapia como de radioterapia, muito devido às suas propriedades de auto renovação, expressão de elevados níveis de transportadores ABC, resistência a apoptose e outros mecanismos como reparação ativa de DNA. (1) (3)

As CSC possuem uma resistência intrínseca à radioterapia, assim como uma notável capacidade de reparação e recuperação, entre sessões de radioterapia, dos danos causados pela irradiação; de reconstituição da massa tumoral; de construção de um microambiente em estado de hipoxia, tal como outros fatores. Existe evidência que as CSC têm uma resistência a tratamentos de radioterapia superior à das restantes células tumorais. (6)

Adicionalmente, estudos realizados com células tumorais revelaram que esta subpopulação de células é também resistente a tratamentos de quimioterapia devido aos seus altos níveis de transportadores ABC que “bombeiam” os fármacos para o meio extracelular, protegendo as CSC do efeito citotóxico destes agentes. (3)

Descobertas recentes sugerem que outros transportadores, incluindo o “*octreotide*” (Oct) I, também podem ter o seu contributo no que concerne a resistência a certos fármacos usados em quimioterapia. (3)

Para além dos mecanismos de resistência supracitados, as CSC possuem a capacidade de abrandar o seu ciclo celular ou mesmo entrar num estado estacionário, na fase G₀, podendo depois, via estímulo, entrar novamente no ciclo de divisão celular e, por conseguinte originar outras células tumorais com um fenótipo quimio-resistente. Os clones de CSC que apresentam e dão origem a células tumorais com elevada eficácia na reparação de DNA têm um maior grau de resistência. Como exemplo existe um estudo onde CSC que expressam o marcador CD133 possuem níveis de proteína “*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*” (MGMT) trinta vezes superiores em relação a CSC CD133⁻, sendo as primeiras mais resistentes a radioterapia. Os doentes com maior expressão da proteína MGMT acabam por demonstrar um tempo médio de vida menor quando comparado com os doentes com baixos níveis desta proteína. (3)

Outro agente que desempenha um papel importante na conferência de resistência às CSC é a enzima ALDH I (Aldeído desidrogenase I). Esta é uma enzima com funções de

desintoxicação e, como tal, a sua elevada expressão em CSC confere resistência a fármacos utilizados em quimioterapia como é exemplo a ciclofosfamida. (3)

O marcador CD44, uma glicoproteína transmembranar envolvida na adesão célula-célula e célula-meio extracelular, encontra-se expresso em CSC de vários tumores e, como tal, tem sido um alvo estudado para a terapêutica anti tumoral. Contudo, esta glicoproteína também é expressa por muitas células estaminais adultas existentes nos mais diversos tecidos, o que poderá suscitar o aparecimento de efeitos adversos nos doentes. Estes efeitos indesejáveis podem ser evitados vetorizando o fármaco para as isóformas desta molécula que são específicas das CSC como é exemplo a CD44v6. No entanto, foram reportados casos de grave toxicidade a nível da pele em ensaios clínicos de fase I com Bivatuzumab (anticorpo anti-CD44v6) acoplado a mertansina, um agente citotóxico capaz de inibir a formação de microtúbulos, em doentes com carcinoma de células escamosas na cabeça e pescoço. (4) (7)

Outro mecanismo que confere às CSC uma grande resistência à radioterapia é o seu potencial acrescido de defesa contra as espécies reativas de oxigénio (ROS), visto que estas últimas desempenham uma função essencial no efeito causado pela radiação a nível do DNA. Dados recentes sugerem que os genes envolvidos na eliminação das ROS estão sobre expressos em CSC $CD44^+CD24^{low}Lin^-$ de tumores mamários.

O estado de hipoxia, assim como elevadas concentrações de lactato, aumentam a resistência das CSC e das restantes células tumorais a tratamentos de radioterapia, dificultando o controlo da doença. “*Hypoxia-inducible factor*” (HIF)-2alfa e os genes que o regulam aparentam ser expressos preferencialmente em células estaminais de glioma quando comparado com outras linhas celulares, tumorais ou normais. Em caso de uma exposição prolongada a um estado de hipoxia, via HIF-2alfa, poderá ocorrer uma alteração de fenótipo nas restantes células tumorais, capacitando-as de certas propriedades semelhantes às CSC. (6)

Utilização de nanopartículas nas terapêuticas contra *Cancer Stem Cells*

As nanopartículas oferecem vantagens evidentes quando comparadas com os fármacos habitualmente usados na prática clínica. São exemplo destas vantagens o aumento da biodisponibilidade do fármaco, do tempo de semivida deste e a diminuição de danos causados nos tecidos saudáveis. Além disso, a nova geração de nanopartículas apresenta-se como multifuncional, isto é, combinam o princípio ativo com moléculas que se ligam seletivamente ao alvo pretendido e, em diversos casos, estas possuem também compostos que permitem uma deteção através de métodos de diagnóstico como raio-X, ressonância magnética (MR) ou “*positron emission tomography*” (PET). Estes nano dispositivos, denominados de construções “*theranostic*” oferecem uma prometedora diminuição da toxicidade de fármacos e um aumento da seletividade dos tecidos tumorais, melhorando a resposta à doença. (8)

Como anteriormente mencionado, as CSC exibem resistência a tratamentos de quimioterapia, sendo esta característica possível de ser contornada recorrendo a terapêuticas com nanopartículas, visto que estas têm a capacidade de transportar elevadas concentrações de fármaco, libertando este, seletivamente, no ambiente tumoral, levando à morte das CSC. A adição de ligandos específicos na superfície de nanopartículas permite que haja um aumento da seletividade para determinado alvo e uma maior facilidade na posterior penetração celular do fármaco. Estas particularidades têm sido exploradas por diversos grupos de investigação para a sua aplicação em terapêuticas cujo alvo são as CSC. (8)

Ao longo desta secção irei dar a conhecer alguns exemplos de estratégias de tratamento com nano dispositivos.

Terapêutica com recurso a hipertermia mediada por nanopartículas

Heat-based therapies, que envolvem o aumento da temperatura, em regiões específicas do corpo, acima dos 43°C (hipertermia) ou 55°C (ablação termal), são opções terapêuticas bem estabelecidas para o tratamento de tumores refratários e metástases. Elevando a temperatura do tumor para um nível supra fisiológico, aumenta o *uptake* do fármaco e a oxigenação do ambiente tumoral (um modificador positivo da resposta à radioterapia), assim como exerce efeitos citotóxicos diretos. Dados recentes sugerem que as CSC possuem resistência a diversos tratamentos térmicos convencionais, contudo os últimos avanços no

desenvolvimento de nanopartículas capazes de absorver energia na gama dos infravermelhos e radiofrequência possibilita um tratamento térmico seletivo para os tecidos tumorais com invasão mínima dos tecidos saudáveis. (8)

Utilizando este método, as nanopartículas são aplicadas na lesão alvo através de injeção direta ou de administração intravenosa seguida de acumulação passiva ou vetorizada no local do tumor. O passo seguinte do procedimento passa pela irradiação com energia na gama de infravermelhos ou radiofrequência, estimulando as nanopartículas que localmente irão gerar elevação da temperatura, provocando a morte das células tumorais. (8)

Num estudo de Burke e seus colaboradores foi investigada a resposta de CSC de tumores mamários a tratamentos de hipertermia convencional e de hipertermia mediada por nanopartículas (NMH) para determinar a eficácia de cada um dos métodos na eliminação deste tipo de células. Eles concluíram que as CSC em estudo eram mais resistentes aos efeitos citotóxicos da hipertermia convencional quando comparadas com as restantes células tumorais, sendo essa resistência devido aos elevados níveis de *heat shock protein 90* (HSP 90). O tratamento de hipertermia convencional aplicado numa população composta por CSC de tumores mamários e por outras células tumorais conduziu a um aumento da percentagem de CSC dentro do grupo de células sobreviventes. Contudo os investigadores foram capazes de eliminar esta resistência usando a técnica NMH. Neste estudo foi conseguido gerar um aumento preciso da temperatura nas células alvo expondo estas a nanotubos de carbono com uma membrana de polietilenoglicol com posterior aquecimento destes com laser de infravermelhos (1064 nm). Os resultados obtidos mostraram que a eliminação de CSC era proporcional ao tempo de exposição à fonte de laser. Esta técnica conduz a uma rápida permeabilização da membrana e morte por necrose das células alvo, sendo igualmente eficaz nas CSC e nas restantes células tumorais, levando a uma regressão total do tumor e 100% de sobrevivência quando aplicada em murganhos, enquanto os grupos controlo apresentaram mais de 80% de mortalidade nos mesmos pontos temporais. (8)

O método NMH também pode ser utilizado para tornar as CSC mais sensíveis a outras terapêuticas como por exemplo, radioterapia. Este género de estratégia terapêutica foi investigada por Atkinson *et al*, usando *nanoshells* de ouro, recorrendo a uma fonte de laser de infravermelhos para gerar elevação da temperatura ($\approx 42^{\circ}\text{C}$) e, associar a este método o tratamento com radioterapia. Neste estudo confirmou-se que a fração de CSC era resistente a radioterapia, no entanto, quando precedida com o tratamento por hipertermia com *nanoshells*, houve uma redução de mais de 50% da fração de CSC na população de células sobreviventes. (8) Mais ainda, as células provenientes de tumores

tratados com esta terapêutica combinada apresentaram-se menos carcinogênicas, dando origem a tumores menos agressivos e mais diferenciados (quando estes se formavam) após transplante em novos hospedeiros. (8) Ensaios clínicos em humanos com estas partículas, intituladas de Aurolase® estão atualmente em curso. (8)

Num estudo de prova de princípio, Galanzha *et al.* recorreram ao uso da técnica de citometria de fluxo foto acústica e foto térmica, *in vivo*, para a detecção e eliminação de CSC presentes na circulação sanguínea, mais especificamente nos vasos superficiais. O objetivo do estudo consistia em conseguir diferenciar, no conjunto de células tumorais circulantes, aquelas que possuíam fenótipo de CSC das restantes células que constituem o *bulk* tumoral. (9)

Os autores deste estudo conjugaram nanotubos de monocamada de carbono com invólucro de ouro, capazes de absorver radiação infravermelha e nanopartículas magnéticas esféricas com folato (para identificação das células do *bulk* tumoral) ou anticorpo anti CD44 humano, para marcar as CSC que sobre expressam o marcador CD44. (8) (9) As células ligadas a nanopartículas podiam ser identificadas através de ondas foto acústicas geradas pelo complexo célula-nanopartícula aquando excitação com uma fonte laser. Usando este método, foi demonstrado que as raras CSC circulantes CD44⁺ podiam ser detetadas nos vasos sanguíneos de murganhos nus, transplantados com tumores mamários de origem humana. Os autores sugerem que estas células podem ser posteriormente eliminadas através do efeito do tratamento foto térmico recorrendo a uma fonte de infravermelhos. (8) (10) (11)

Como existe a possibilidade das CSC circulantes serem as primeiras a despoletar o processo metastático, esta tecnologia oferece um método capaz de eliminar estas da circulação sanguínea evitando assim a incidência de metástases. (8)

Wang *et al* desenvolveram um nano dispositivo que consistia em nanotubos de carbono (monocamada) conjugados com quitosano e o anticorpo monoclonal anti-CD133, sendo o objetivo eliminar seletivamente as células GMB (Glioblastoma multiforme) CD133⁺, também designadas CSC, através de libertação de calor no seu micro ambiente após irradiação com uma fonte de laser NIR (*Near-Infrared*). (12) Ao anticorpo foi acoplado um complexo proteína-cromóforo chamado ficoeritrina para auxiliar na posterior identificação/monitorização do dispositivo em estudo. (12)

Os nanotubos de carbono foram adicionados, separadamente, a uma cultura de células GBM-CD133⁺ e a outra cultura de células GBM-CD133⁻. Os resultados desta ação evidenciaram que os nanotubos foram internalizados em quantidades significativas pelas primeiras enquanto nas segundas, estes permaneceram no meio extracelular. (12) As

mesmas células que internalizaram os nanotubos foram, posteriormente, seletivamente eliminadas, com recurso a uma fonte de laser NIR cujo comprimento de onda era 808 nm, numa cultura que continha tanto células GBM-CD133⁺ como GBM-CD133⁻. Este efeito fototermolítico causado pelos nanotubos também demonstrou ser capaz de inibir o posterior crescimento destas CSC em murganhos após tratamento. (12) As células GBM-CD133⁺, previamente tratadas com os nanotubos e irradiadas com o laser NIR, perdiam a sua capacidade de auto renovação e o seu poder carcinogénico. Em contrapartida, as células GBM-CD133⁺ que não sofreram tratamento ou que após internalização dos nanotubos não foram irradiadas apresentavam estas características inalteradas. (12)

As células GBM-CD133⁺, previamente expostas aos nanotubos de carbono, foram injetadas na zona subcutânea de murganhos, sendo estes sujeitos, 2 dias depois, a tratamento com uma fonte laser NIR, absorvida pelos nanotubos, criando um aumento de temperatura devido a libertação de energia em forma de calor. (12) Esta energia tornou-se suficiente para destruir as CSC presentes no tumor e, conseqüentemente inibir uma recidiva ou aparecimento de metástases. (12)

A capacidade destes nanotubos de carbono se ligarem seletivamente às CSC, ou seja, às células GBM-CD133⁺ aquando da presença adicional de outras células, como por exemplo as GBM-CD133⁻, libertando energia em forma de calor no micro ambiente das células alvo, permite que estas sejam eliminadas, após exposição a uma fonte laser NIR, sem causar efeitos nefastos nas células saudáveis adjacentes. (12)

Em suma, este estudo realizado traz-nos uma nova possibilidade de tratamento anti tumoral, sendo neste caso específico o tratamento de glioblastoma multiforme.

Vetorização contra biomarcadores

Num estudo conduzido por Lim *et al*, uma nanopartícula de curcumina, chamada de *NanoCurc*TM, foi testada no tratamento de células estaminais de tumor cerebral. Os resultados demonstraram um decréscimo de mais de 50% da população de células estaminais CD133⁺ em duas das linhas celulares testadas, o que sugere uma possível atividade contra a fração de CSC em alguns tumores cerebrais, nomeadamente meduloblastoma e glioblastoma. (8)

Wang *et al* descreveram o uso de um novo anticorpo anti-CD44 conjugado a um lipossoma, sendo o alvo as CSC hepáticas com elevado poder carcinogénico e elevado potencial metastático que expressavam os marcadores CD44 e CD90. Estes lipossomas vetorizados continham doxorubicina, tendo sido injetados por via intravenosa em

murganhos, resultando num acumulo sete vezes superior de fármaco no tumor, quando comparado com a forma livre deste, o que conduziu a um maior decréscimo do volume tumoral. Estes resultados foram alcançados sem que surgissem mudanças significativas na massa corporal do murganho. (8)

Vetorização de vias de sinalização de CSC

As nanopartículas carregadas com moléculas vetorizadas para atuar em vias de sinalização específicas são outra alternativa para a erradicação de CSC. Apesar dos marcadores de superfície poderem ser comuns com as células estaminais normais, existem muitas diferenças das CSC em relação a estas últimas, nomeadamente as alterações das vias de sinalização e do metabolismo, que podem ser exploradas com recurso a nano dispositivos e as suas características de vectorização da terapêutica. As vias de sinalização de potencial interesse são por exemplo: *Wnt/β-catenin*, *hedgehog*, e *Notch*. (3)

Como exemplo temos a aplicação de inibidores da γ -secretase (IGSs) no tratamento do cancro para bloquear a via de sinalização *Notch*. Como o seu uso está limitado pelas suas características hidrófobas e os seus efeitos secundários Mamaeva *et al* desenvolveram nanopartículas de sílica mesoporosa como veículo para o transporte vetorizado desta molécula com o intuito de conseguir bloquear a via de sinalização *Notch*. (3) O recetor de folato encontra-se sobre expresso nas células de diversos tumores, como tal, a ligação covalente de folato à superfície externa destas nanopartículas permite que estas só se liguem às células que possuem este recetor como é o caso das CSC. Inibindo esta via de sinalização, condicionam-se as funções das CSC, guiando a um decréscimo do volume tumoral. (3)

Conclusão

A informação apresentada ao longo deste trabalho dá força à existência de CSC em diversos tumores sólidos, assim como em casos de leucemia, estando estas conectadas com o processo de iniciação e progressão do tumor, tal como têm vindo a ser identificadas como a possível causa para o aparecimento de metástases. Tal facto ganha consistência ao constatar-se que as CSC possuem *tumor-initiating capacity*, o que é um requisito obrigatório para estabelecer tumores secundários em órgãos distantes e que estas expressam marcadores EMT (*epithelial-mesenchymal transition*), o que sugere que têm capacidade para migrar.

As CSC possuem características específicas, como por exemplo a sua elevada capacidade de auto renovação, o seu processo eficaz de reparação de DNA, a sobre expressão de transportadores ABC, entre outros mecanismos, que as tornam uma das possíveis causas para o aparecimento de recidivas do tumor após tratamento.

Novos avanços têm sido alcançados no desenvolvimento de nanopartículas e na integração destas em terapêuticas anti tumorais cujo principal alvo são as CSC, nomeadamente a nível de terapêuticas com recurso a hipertermia, com ou sem radioterapia como tratamento adjuvante, que têm apresentado resultados promissores embora os estudos estejam em fases embrionárias.

Seja qual for a estratégia assumida no desenvolvimento da nanopartícula e em como esta irá atuar após a sua entrada no organismo, tem vindo a ser evidenciado um certo padrão em termos de constituintes bases. Estes passam por conjugar à nanopartícula ligandos específicos, vetorizando estas de forma seletiva para as CSC através da ligação a marcadores específicos presentes nas membranas destas; acoplar um agente de diagnóstico que permita monitorizar o tratamento; incorporar um agente capaz de tornar a célula mais sensível ao agente terapêutico utilizado e por fim, sendo o mais importante, o agente anti tumoral que poderá ser um fármaco ou a própria nanopartícula.

Embora já sejam conhecidos alguns marcadores de superfície de CSC, a vetorização da terapêutica para estas ainda é algo de bastante complexo visto que os biomarcadores não são transversais a todos os tipos de CSC e, em certas ocasiões, estas últimas não apresentam qualquer marcador de superfície.

A elevada frequência de mutações nestas células e todos os seus mecanismos de adaptação a ambientes desfavoráveis faz com que as CSC sejam ainda um grande desafio para a comunidade científica. No entanto, todo o conhecimento já adquirido, todos os resultados

positivos já alcançados abrem de certa forma os horizontes sobre esta temática e fazem acreditar que esteja mais próximo o objetivo de obter uma terapêutica totalmente eficaz para o cancro.

Referências Bibliográficas

1. XIAOYAN, N., JIANCHANG, S., YIQI, D., QIWEN, B., ZHAOSHEN, L. - Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. *Cancer Biology & Therapy*. 14:4 (2013) 295–303.
2. CHEN, K., HUANG, Y., CHEN, J. - Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*. 34 (2013) 732–740.
3. WANG, K., WU, X., WANG, J., HUANG, J. - Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*. 8 (2013) 899–908.
4. BACCELLI, I., TRUMPP, A. - The evolving concept of cancer and metastasis. *The Journal of Cell Biology*. 198, 3 (2012) 281–293.
5. TOMAO, F., PAPA, A., ROSSI, L., STRUDEL, M., VICI, P., LO RUSSO, G., TOMAO, S. - Emerging role of cancer stem cells in the biology and treatment of ovarian cancer: basic knowledge and therapeutic possibilities for an innovative approach. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 32 (2013).
6. KRAUSE, M., YAROMINA, A., EICHELER, W., KOCH, U., BAUMANN, M. - Cancer Stem Cells: Targets and Potential Biomarkers for Radiotherapy. *Clinical Cancer Research*. 17 (2011) 7224-7229.
7. RIECHELMANN, H., SAUTER, A., GOLZE, W., HANFT, G., SCHROEN, C., HOERMANN, K., ERHARDT, T., GRONAU, S. - Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 44, 9 (2008) 823-829.
8. BURKE, A. R., SINGH, R. N., CARROLL, D. L., TORTI, F. M., TORTI, S. V. - Targeting Cancer Stem Cells with Nanoparticle-Enabled Therapies. *J Mol Biomark Diagn*. 8 (2013).
9. GALANZHA, E. I., KIM, J., ZHAROV, V. P. - Nanotechnology-based molecular photoacoustic and photothermal flow cytometry platform for in vivo detection and killing of circulating cancer stem cells. *J Biophotonics*. 2, 12 (2009) 725-735.
10. GALANZHA, E. I., SHASHKOV, E. V., KELLY, T., KIM J., YANG, L., ZHAROV, V.P. - In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells. *Nature Nanotechnology*. 4 (2009) 855-860.
11. KIM, J., GALANZHA, E. I., SHASHKOV, E. V., MOON, H., ZHAROV, V. P. - Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents. *Nature Nanotechnology*. 4 (2009) 688-694.

12. WANG, C., CHIOU, S., CHOU, C., CHEN, Y., HUANG, Y., PENG, C. -
Photothermolysis of glioblastoma stem-like cells targeted by carbon nanotubes conjugated
with CD133 monoclonal antibody. *Nanomedicine: NBM.* 7 (2011) 69-79.