

Descoberta de um novo ativador da p53: promissor agente anticancerígeno no tratamento do cancro colo-rectal

Helena Ramos¹, Liliana Raimundo¹, Maria Isabel Soares², Célia Gomes³, Flávio Reis³, Petr Chlapek⁴, Renata Veselska⁴, Alberto Inga⁵, Teresa M.V.D. Pinho e Melo², Lucília Saraiva¹

¹LAQV/REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal;

²Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal;

³Laboratório de Farmacologia e Terapia Experimental, Instituto Biomédico de Investigação da Luz e da Imagem (IBILI), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal; ⁴Laboratory of Tumor Biology, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ⁵Laboratory of Transcriptional Networks, Center for Integrative Biology, CIBIO, University of Trento, Italy

Introdução: A inativação da proteína supressora tumoral p53, nomeadamente devido à sua interação com inibidores endógenos ou a mutações no gene *TP53*, é um evento chave na carcinogénese¹. Além da perda da atividade supressora tumoral, as proteínas mutadas da p53 (mutp53) estão também dotadas de novas funções oncogénicas¹, associadas a tumores mais agressivos e de pior prognóstico, como o cancro colo-rectal (CRC)². Assim, o restabelecimento da atividade nativa da p53 representa uma estratégia terapêutica muito promissora no tratamento de cancros com elevada prevalência de mutp53, como o CRC².

Objetivos: Com este trabalho pretendeu-se descobrir um ativador da p53 com potencial terapêutico no CRC.

Materiais/Métodos: A atividade antiproliferativa do MANIO foi testada num painel de linhas celulares tumorais humanas com diferentes estados da p53 e sem p53, e em células de doentes com CRC, através dos ensaios de sulforodamina B ou MTT. O ciclo celular e a apoptose foram avaliados por citometria de fluxo. Os níveis proteicos e de mRNA de alvos transcripcionais da p53 foram avaliados por Western Blot e RT-qPCR/RNA-seq, respetivamente. A restauração da capacidade de ligação ao ADN da p53 nativa e mutada foi avaliada através da imunoprecipitação de cromatina (ChIP). A estabilização térmica da mutp53 foi avaliada por *Cellular Thermal Shift Assay* (CETSA), e a interação proteína-ligando por *Microscale thermophoresis* (MST), utilizando as proteínas recombinantes nativa e mutada da p53. A atividade antitumoral *in vivo* foi estudada em modelos de xenograftos de tumores do CRC expressando a p53 nativa/mutada e sem p53.

Resultados: O composto MANIO (pedido de patente³) demonstrou potente atividade antiproliferativa nas linhas tumorais que expressavam p53 nativa/mutada ($0.20 \mu\text{M} < \text{GI}_{50} < 3.20 \mu\text{M}$), quando comparada com linhas tumorais sem p53 ($\text{GI}_{50} > 30 \mu\text{M}$), associada a paragem de ciclo celular, promoção de apoptose, e sobreexpressão de genes/proteínas alvo da p53. MANIO reduziu significativamente os valores de GI_{50} em células tumorais sem p53 que expressavam ectopicamente diferentes mutp53, indicando uma reativação destas mutp53. Este efeito foi confirmado na mutp53 com maior prevalência em cancros humanos (R248W). De facto, MANIO demonstrou ser capaz de interagir diretamente com a mutp53 R248W (assim como p53 nativa),

levando à sua estabilização térmica, restaurando a sua capacidade de ligação ao ADN e subsequente atividade transcricional. MANIO demonstrou atividade antitumoral dependente da p53 em xenograftos de tumores do CRC, sem sinais aparentes de toxicidade. O composto apresentou ainda marcada atividade citotóxica em células de doentes com CRC e efeitos sinérgicos com quimioterápicos convencionais usados no tratamento do CRC.

Conclusão: MANIO é um potente e seletivo ativador da p53 com promissora aplicação no tratamento personalizado de doentes com CRC que expressam a forma nativa ou mutada da p53.

1 – Kasthuber ER, Lowe SW. Cell. 2017;170(6):1062-1078.

2 – Nakayama M, Oshima M. J Mol Cell Biol. 2019 Apr 1;11(4):267-276.

3 – Saraiva L; Melo T; Ramos H; Soares J; Soares MI. Portuguese Provisional Patent N° 110795 - Universidade do Porto 2018.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu o apoio financeiro de: União Europeia (fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE) fundos nacionais (FCT/MEC, Fundação para a Ciência e Tecnologia e Ministério da Educação e Ciência) pelos projetos UID/QUI/50006/2019, COMPETE 2020 (POCI-01-0145-FEDER-006684/POCI-01-0145-FEDER-007440) e, (3599-PPCPT) PTDC/DTP-FTO/1981/2014 – POCI-01-0145-FEDER-016581; FCT através das bolsas de doutoramento SFRH/BD/119144/2016 (H. Ramos), SFRH/BD/117949/2016 (L. Raimundo), e Programa Operacional Potencial Humano (POCH), em particular o Programa Doutoral BiotechHealth (PD/00016/2012).

Informações do Primeiro Autor

Helena Isabel Nogueira Ramos Rocha

Rua Jorge Viterbo Ferreira, nº228, 4050-313 Porto

helenainrr@gmail.com

+351919829647

LAQV/REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto