

ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* E DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO E DA INVASÃO CELULAR INDUZIDA POR PEPTÍDEOS DERIVADOS DE BRN-2

Vitória Rodrigues Guimarães Alves¹; Fernanda Fernandes Miranda da Cunha²; Luiz Rodolpho Raja Gabaglia Travassos³; Denise Costa Arruda⁴

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: vitoria.guimaraes@outlook.com 1

Estudante de Mestrado de Biotecnologia; e-mail: cunha.fernandes@gmail.com 2

Professor da Universidade Federal de São Paulo; e-mail: travassos@unifesp.br 3

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: denisearr@gmail.com 4

Área do Conhecimento: Biologia Celular

Palavras-chave: Peptídeos; Brn-2; Migração; Melanoma

INTRODUÇÃO

O fator de transcrição Brn-2 está relacionado com o desenvolvimento normal de melanócitos, porém, encontra-se superexpresso em melanomas, estando envolvido com a formação e crescimento tumoral. Além disso, regula a expressão de PDE5A e MITF, ativando um comportamento celular invasivo e promovendo metástases (INAMDAR *et al.*, 2010; WELLBROCK *et al.*, 2008). Peptídeos derivados de Brn-2 poderiam competir com seu sítio de ligação no DNA e desta forma inibir seus efeitos regulatórios na expressão de MITF e de PDE5A.

OBJETIVOS

Determinar os efeitos de peptídeos derivados do fator de transcrição Brn-2 na inibição da invasão e migração celular.

METODOLOGIA

Ensaio de MTT: As células B16F10-Nex2 ($5 \times 10^3/96$ poços) foram plaqueadas e após 24hs foram incubadas na estufa de CO₂ a 37°C com os peptídeos nas concentrações de: 1mM, 0,75mM, 0,5mM, 0,25mM, 0,125mM, 0,06mM, diluídos em meio RPMI na presença de 1% de DMSO. Células não tratadas foram incubadas com meio RPMI e 1% de DMSO. Após 24hs de tratamento foi adicionado nos poços 0,5mM de MTT e a placa foi incubada, protegida da luz, por 5 horas. Após incubação com MTT foi adicionado 100µl de SDS 10%, para lise celular, a mesma foi incubada na estufa de CO₂ “overnight” a 37°C, protegida da luz. A absorbância foi determinada à 570nm utilizando um espectrofotômetro. *Ensaio de Migração Celular:* As células B16F10-Nex2 ($1,5 \times 10^5$ /12 poços) foram plaqueadas e após 24hs foram feitas lesões verticais em todos os poços, com auxílio de uma ponteira de micropipeta (1.000µl). As células foram tratadas com 1mM dos peptídeos 1, 3, 4, 6 ou 7, ou com 0,25mM dos peptídeos 1, 3 e 4. Células controle foram incubadas com RPMI na presença de DMSO 1%. Imagens foram capturadas no tempo 0 e nos tempos de tratamento: 2, 4 e 24hs após as lesões terem sido feitas. A distância percorrida pela migração celular foi determinada

subtraindo-se a distância percorrida nos tempos de 2, 4 e 24hs da distância determinada no tempo inicial (0h).

RESULTADOS

Para determinar uma concentração subtóxica dos peptídeos derivados de Brn-2 as células B16F10-Nex2 foram plaqueadas em placas de 96 poços, após 24hs, foram tratadas com os peptídeos em diferentes concentrações. Como controle, as células foram tratadas com DMSO. Após o tempo de incubação, foi realizado o experimento de MTT para determinação da viabilidade celular.

Os peptídeos 1, 3, 4, 6 e 7 não apresentaram efeito citotóxico para as células, nem mesmo na maior concentração utilizada (1mM), quando comparados com o controle (Figura 1).

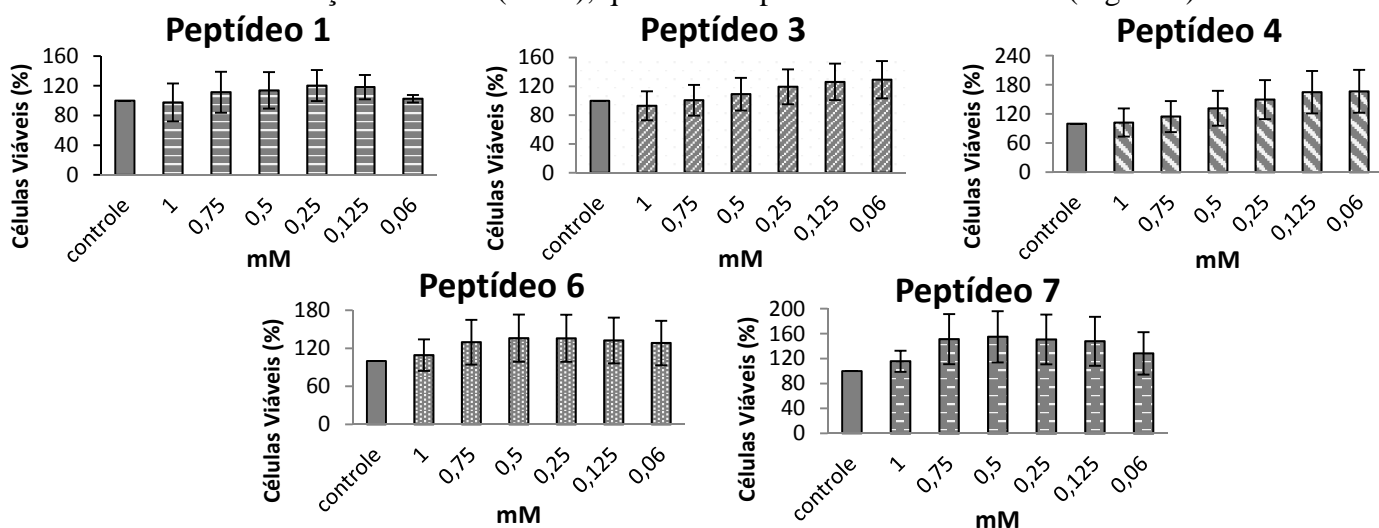
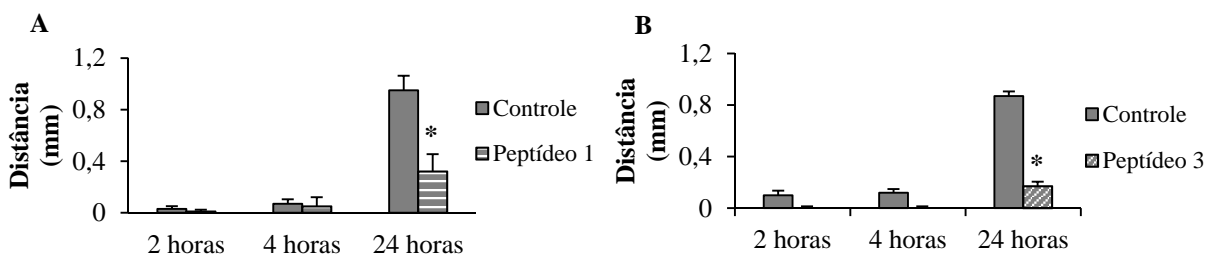


Figura 1: Ensaio de viabilidade celular em células B16F10-Nex2. Células B16F10-Nex2 (5×10^3 células/poço, placa de 96 poços) foram incubadas com os peptídeos 1, 3, 4, 6 e 7 em diferentes concentrações por 20h a 37°C, 5% CO₂. Viabilidade celular foi determinada por ensaios de MTT. Resultados representam a porcentagem de células viáveis em cada poço. Controle - Células cultivadas na ausência do peptídeo e na presença de 1% DMSO. Os experimentos foram feitos em triplicata, em 3 experimentos independentes. Leitura da absorbância da placa (570nm) foi feita utilizando um espectrofotômetro.

Sabendo-se que a concentração de 1mM dos peptídeos não induziu a morte celular, iniciamos os estudos de migração utilizando esta concentração. Para a determinação do efeito dos peptídeos na inibição da migração celular as células B16F10-Nex2 foram plaqueadas em placas de 12 poços, após 24hs foram feitas as lesões verticais. O tratamento foi feito com os peptídeos nas concentrações de 1mM (Figura 2) e 0,25mM (Figura 3) as células controle foram tratadas com meio RPMI na presença de DMSO.

Os peptídeos 1 (Figura 2A), 3 (Figura 2B), 4 (Figura 2C) e 7 (Figura 2E) apresentaram inibição da migração celular, quando comparados ao controle. O peptídeo 6 (Figura 2D), entretanto, não apresentou diferença significativa na migração celular, quando comparado com células não tratadas.



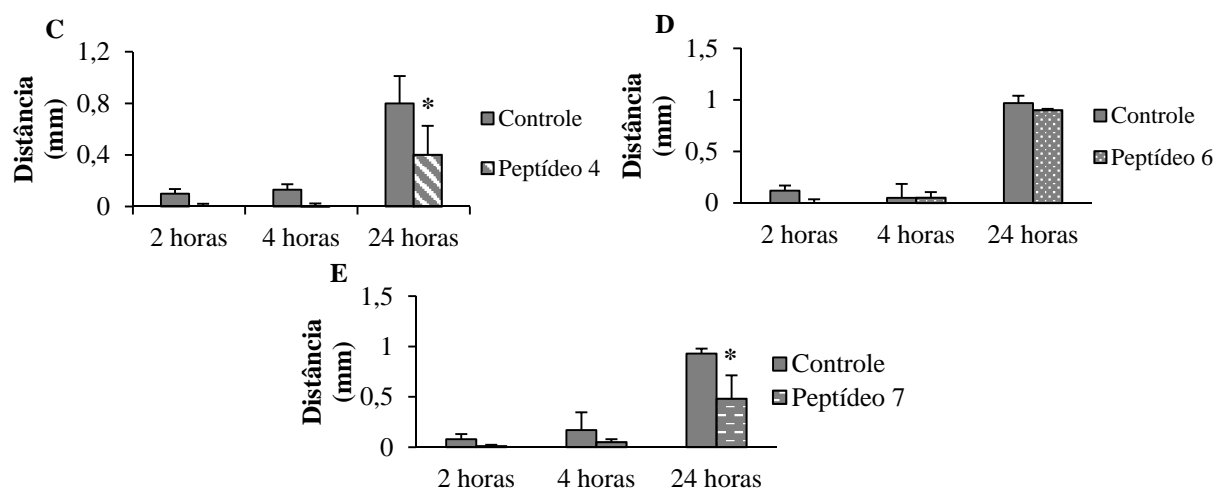


Figura 2: Determinação da distância percorrida por células tratadas com peptídeos derivados de Brn-2. Migração celular de B16F10-Nex2 ($1,5 \times 10^5$ células/poço, placa de 12 poços) foi determinada após incubação com os peptídeos 1 (A), 3 (B), 4 (C), 6 (D) e 7 (E) (1mM) por 24h a 37° , 5% CO_2 . Controle - Células cultivadas na ausência do peptídeo e na presença de meio RPMI e DMSO. Altura das barras é equivalente à distância em milímetros (mm) percorrida pelas células durante a migração, a qual foi obtida por meio da subtração dos valores observados em 0h para cada um dos outros tempos, 2, 4 e 24h. (*) - resultados significativos, sendo $p < 0,05$.

Devido aos resultados promissores utilizando-se a concentração de 1mM, foram realizados novos experimentos utilizando uma concentração menor dos peptídeos (0,25mM), para determinar a menor concentração do peptídeo que era capaz de inibir o processo de migração celular. Para isso foram utilizados somente os peptídeos que tiveram um maior efeito na concentração de 1mM, os peptídeos 1, 3 e 4 (Figura 3).

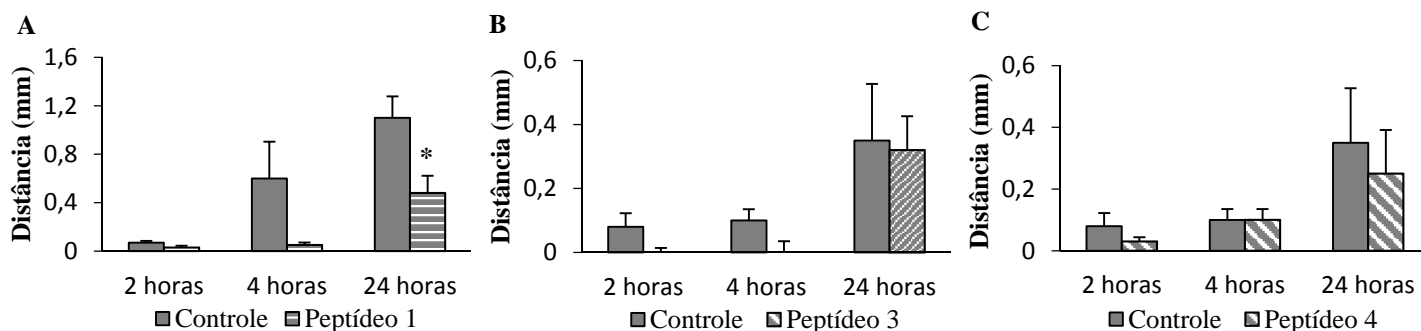


Figura 3: Determinação da distância percorrida por células tratadas com peptídeos derivados de Brn-2. Migração celular de B16F10-Nex2 ($1,5 \times 10^5$ células/poço, placa de 12 poços) foi determinada após incubação com os peptídeos 1 (A), 3 (B) e 4 (C) (0,25mM) por 24h a 37° , 5% CO_2 . Controle - Células cultivadas na ausência do peptídeo e na presença de meio RPMI e DMSO. Altura das barras é equivalente à distância em milímetros (mm) percorrida pelas células durante a migração, a mesma foi obtida por meio da subtração dos valores observados em 0h para cada um dos outros tempos, 2, 4 e 24h. (*) - resultados significativos, sendo $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Por serem derivados do fator de transcrição Brn-2, os peptídeos testados podem interferir no desenvolvimento do melanoma, como por exemplo, inibindo a migração celular, a qual foi demonstrada nas figuras 2 e 4. Além disso, poderiam competir com o sítio de ligação da proteína Brn-2 ao DNA e desta forma regular a transição de Fosfodiesterase 5 (PDE5A) e aumentar os níveis de Ca^{+2} intracelular, que estão relacionados com a invasão de células

melanocíticas e com a promoção de metástases, tumores secundários formados a partir de células do tumor original que migram para outros órgãos (ARAZARENA *et al.*, 2011; BESCH & BERKING, 2014).

Como pôde ser observado na figura 1 nenhum dos peptídeos testados apresentou efeito citotóxico *in vitro* em células B16F10-Nex2 na concentração de 1mM, não havendo, desta forma, uma perturbação no ciclo de vida ou morte celular que tenha sido causada pela presença dos peptídeos utilizados nos poços durante o período de incubação.

Estes peptídeos mostraram um efeito importante na inibição da migração celular, com exceção ao peptídeo 6 que não apresentou efeito significativo. Esses resultados puderam ser confirmados a partir da medida da distância percorrida pelas células durante a migração celular, observada na figura 2 que, de maneira clara, aponta como sendo os peptídeos 1, 3 e 4 os que possuem um efeito mais pronunciado na inibição da migração celular de células B16F10-Nex2 na concentração de 1mM.

Entretanto, o experimento realizado com os peptídeos 1, 3 e 4 em uma concentração de 0,25mM demonstrou que o peptídeo 1 ainda possui efeito na inibição da migração celular mesmo em concentrações mais baixas, o que não foi observado nos peptídeos 3 e 4. Este dado é de suma importância para estudos futuros que visem o desenvolvimento de uma nova droga anticâncer, visto que, o peptídeo ainda mantém seu efeito inibitório da migração celular de células melanocíticas mesmo sendo utilizado em concentrações mais baixas.

CONCLUSÃO

Os peptídeos testados, derivados do fator de transcrição Brn-2, não demonstraram efeito citotóxico para as células B16F10-Nex2 de melanoma murino, nem mesmo na maior concentração utilizada (1mM). No entanto, apresentaram um efeito significativo na inibição de sua migração, com exceção ao peptídeo 6. Além disso, foi determinado a inibição da migração celular utilizando uma menor concentração dos peptídeos, ficou evidente que o peptídeo 1 é o que mantém seu efeito inibitório na migração de células melanocíticas. Por fim, também foi demonstrado que os peptídeos 1 e 3 na concentração 1mg/camundongo/dia não apresentaram toxicidade para camundongos machos C57Bl/6 durante o tratamento realizado por três dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAZARENA, I. *et al.* **Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A.** *Cancer Cell*, 45-57. 2011.
- BESCH, R.; BERKING, C. **POU transcription factors in melanocytes and melanoma.** *European Journal of Cell Biology*, 55-60. 2014.
- INAMDAR, G. S. *et al.* **Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail.** *Biochem Pharmacol*, 624-637. 2010.
- WELLBROCK, C. *et al.* **Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF.** *PLoS One*, 3(7):e2734. Doi: 10.1371/journal.pone.0002734. 2008.