

DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS INIBITÓRIOS NA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO POR PEPTÍDEOS DERIVADOS DE BRN-2 EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO E DO EFEITO PROTETOR *IN VIVO* INDUZIDO PELOS PEPTÍDEOS NO MODELO METASTÁTICO

Victória Santos Souza¹; Thaysa Paschoalin²; Heron Fernandes Vieira Torquato³; Edgar Julian Paredes-Gamero⁴; Luiz Rodolpho Travassos⁵; Denise Costa Arruda⁶.

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: victoriasouzabr@gmail.com ¹

Professor da Universidade Federal de São Paulo; e-mail: tpaschoalin@unifesp.br ²

Doutorando em Ciências Biológicas; e-mail: heron.pvt@gmail.com ³

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: edgarparedes@umc.br ⁴

Professor da Universidade Federal de São Paulo; e-mail: travassos@unifesp.br ⁵

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: denisearr@gmail.com ⁶

Área do Conhecimento: Biologia Celular, Biologia Molecular.

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

INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer de pele proveniente de transformação maligna dos melanócitos. O aumento na expressão do fator de transcrição Brn-2 está envolvido com o desenvolvimento tumoral dessas células. Brn-2 é regulado por três vias de sinalização importantes para o desenvolvimento do melanoma, as vias MAPK, PI3K/AKT e Wnt/ β -Catenina (BONVIN, 2012; GOODALL *et al.*, 2004; GOODALL *et al.*, 2004). Quando superexpresso, Brn-2 também é capaz de regular a expressão de várias proteínas, dentre elas PDE5A e MITF, que estão diretamente relacionadas com os processos migração, invasão e metástase (ARAZARENA *et al.*, 2011; GOODALL & CARREIRA, *et al.*, 2008). Peptídeos sintéticos derivados do domínio POU (domínio de ligação ao DNA) do fator de transcrição Brn-2, poderiam competir com os sítios de ligação da proteína no DNA e, desta forma, inibir a ligação da proteína e conseqüentemente bloqueando os efeitos regulatórios na expressão de MITF e PDE5A, inibindo a migração, invasão e conseqüentemente o desenvolvimento de metástase.

OBJETIVOS

Determinar a atividade antimetastática e os efeitos inibitórios na migração celular induzidos por peptídeos derivados do domínio POU (domínio de ligação ao DNA) do fator de transcrição Brn-2 em células de melanoma murino, bem como determinar a interferência destes peptídeos nos níveis intracelulares de cálcio.

METODOLOGIA

Ensaio de migração: Para determinar o efeito inibitório dos peptídeos na migração celular, células B16F10-Nex2 (3×10^5) foram semeadas em placas de 12 poços e após 24h foram feitas “feridas” verticais na monocamada de células tratadas e não tratadas, com o auxílio de uma ponteira de micropipeta e as células das margens tenderam a migrar para os espaços vazios. As células foram tratadas com 0,125 mM do peptídeo E12F e 0,5 mM dos peptídeos C9K e L13S. Os experimentos foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A distância percorrida foi medida nos tempos 0, 2, 4 e 24 h e a média das distâncias foi determinada. A migração celular foi determinada pela

subtração da distância entre as células no tempo 0 causada pela retirada das células e a distância percorrida por elas nos tempos de 2, 4 e 24 h. *Ensaio in vivo – Modelo metastático*: Para a determinação da atividade antitumoral do peptídeo E12F, camundongos C57BL/6 (6 camundongos por grupo) receberam células B16F10-Nex2 (2×10^5) por via endovenosa e após a inoculação, foi realizado o primeiro tratamento utilizando 300 mg/camundongo/dia do peptídeo E12F diluído em PBS e 5% de DMSO durante oito dias. Os camundongos não tratados receberam apenas PBS e 5% de DMSO. Após o fim do tratamento, os camundongos foram sacrificados e os pulmões retirados para contagem dos nódulos com o auxílio de uma lupa. - *Modelo Subcutâneo*: Foi inoculado 1×10^5 de célula B16F10-Nex2 com PBS na região subcutânea de camundongos machos C57BL/6 (5 camundongos por grupo). Cinco dias após a inoculação foi realizado o primeiro tratamento com 300 mg/camundongo/dia dos peptídeos E12F, C9K e L13S, diluídos em PBS e 5% de DMSO durante 6 dias. Os camundongos não tratados receberam apenas de PBS e 5% de DMSO. Os nódulos foram medidos em centímetros na horizontal e vertical, com o auxílio de um paquímetro, cinco dias após o último de tratamento. *Determinação das alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular induzida pelos peptídeos: Fluo4-NW (não-raciométrico)*: As células B16F10-Nex2 foram cultivadas em placas pretas de 96 poços e incubadas com Fluo 4-NW e Probenecid (1 mM) em solução HBSS por 1 h a 37 °C. Após esse tempo de incorporação as células foram estimuladas com os peptídeos E12F (0,25 mM), L13S (0,5 mM) e E24G (1 mM) durante aproximadamente 20 min. A variação máxima de cálcio foi determinada por ionomicina e para o negativo o veículo (HBSS). A variação de intensidade de fluorescência foi lida pelo leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices) com o SoftMax Pro Software de forma temporal, sendo a Ex 490 nm e Em. 510 nm. *Fura-2 (raciométrico)*: As células foram lavadas com HBSS e incubadas com 2 μ M de Fura-2 AM, 1 mM de Pluronic e 1 mM de Probenecid. A variação do basal de cálcio foi quantificada em diferentes tempos (3, 6, 12 e 24 h) após os estímulos com os peptídeos E12F (0,25 mM), L13S (0,5 mM) e E24G (1 mM). A leitura foi realizada pelo leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices) em dois comprimentos de onda (Ex. 340 – Em 510 nm; Ex. 380 – Em 510 nm) programados pelo SoftMax Pro Software.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os peptídeos C9K e L13S, diluídos na concentração de 0,5 mM, mostraram resultados significativos de inibição da migração celular. Entretanto, esses efeitos não foram observados na concentração de 0,25 mM (dados não mostrados). As células tratadas com o peptídeo C9K migraram 0,06 mm e as células não tratadas migraram 0,5 mm, em 24h após a lesão inicial (Figura 1A). As células tratadas com 0,5 mM do L13S migraram 0,07 mm e as células não tratadas migraram 0,5 mm após 24h do início do tratamento (Figura 1B). O peptídeo E12F na concentração de 0,125 mM também apresentou resultados significativos na inibição da migração celular. As células tratadas migraram 0,2 mm, enquanto as células não tratadas migraram 0,8 mm (Figura 1C).

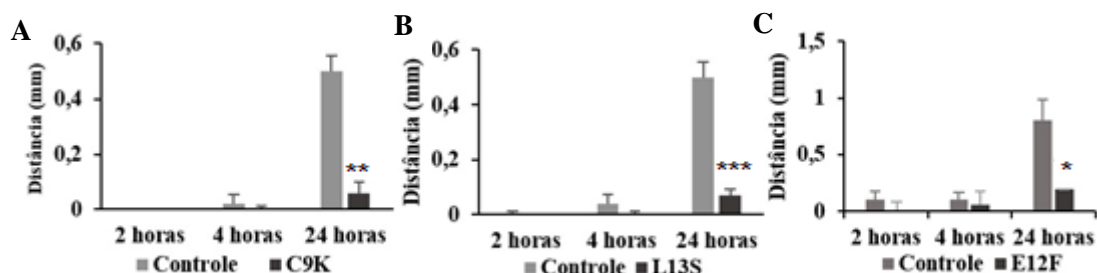


Figura 1: Determinação do efeito inibitório da migração celular induzida pelos peptídeos C9K, L13S

e E12F derivados de Brn-2. Células B16F10-Nex2 foram semeadas e após 24h foram feitas “feridas” verticais na monocamada. As células foram tratadas com os peptídeos C9K (0,50 mM), L13S (0,5 mM) e E12F (0,125 mM), diluídos em meio RPMI e 1% de DMSO. As células não tratadas receberam apenas meio RPMI e 1% de DMSO. Os poços foram fotografados nos tempos 0, 2, 4 e 24hs. A distância percorrida foi medida nos tempos 0, 2, 4 e 24 h e a média das distâncias foi determinada. A migração celular foi determinada pela subtração da distância entre as células no tempo 0 e a distância percorrida por elas nos tempos de 2, 4 e 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. *Teste t.* * $p < 0,005$; ** $p \leq 0,001$; *** $p < 0,05$.

O experimento *in vivo* foi realizado somente com peptídeo E12F, e os resultados mostraram que o peptídeo apresentou efeito protetor em camundongos C57Bl/6, pois o peptídeo foi capaz de diminuir desenvolvimento de nódulos pulmonares. Camundongos tratados possuíam 37 ± 76 nódulos e camundongos não tratados possuíam de 353 ± 57 nódulos pulmonares (Figura 2). Entretanto, esse mesmo efeito não foi observado no modelo subcutâneo após o tratamento, onde o tamanho dos tumores presentes nos camundongos não tratados era similar aos nódulos dos camundongos tratados com os peptídeos (dados não mostrados).

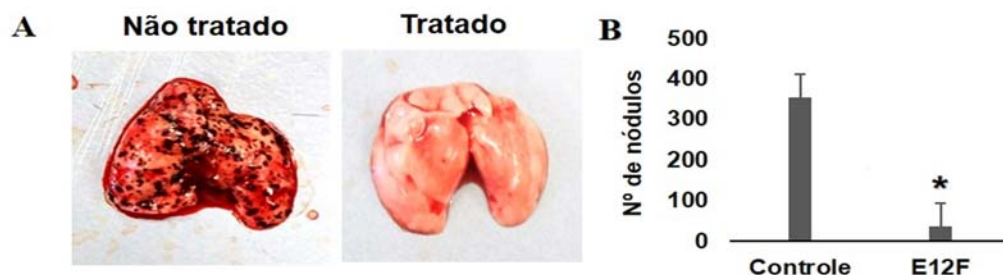


Figura 2: Determinação do efeito protetor *in vivo* no modelo metastático. Foi inoculado 2×10^5 de célula B16F10-Nex2 por via endovenosa. Após a inoculação, foi feito o tratamento com o peptídeo E12F diluído em PBS e 5% de DMSO na concentração 300 mg/camundongo/dia durante oito dias. Os camundongos não tratados receberam apenas PBS e 5% de DMSO. Foram feitos dois experimentos independentes com 6 animais por grupo. * $p < 0,001$.

Para determinar alterações dos níveis de Ca^{2+} intracelular, foi usado um método ratiométrico e um não-ratiométrico. Os resultados obtidos no ensaio não-ratiométrico (Figura 3A) demonstraram que após o estímulo realizado com os peptídeos, houve aumento nos níveis de cálcio intracelular imediatamente após o estímulo com os peptídeos, analisados por 20 minutos. Os resultados do ensaio ratiométrico demonstraram que houve diminuição dos níveis de Ca^{2+} intracelular após 24h de incubação, principalmente com os peptídeos E12F e E24G, em relação às células não tratadas. Esses ensaios foram realizados em triplicata e serão repetidos para confirmação dos resultados.

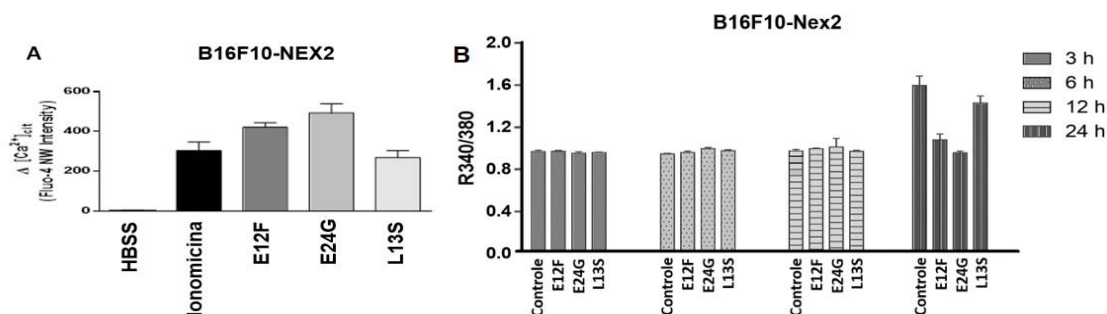


Figura 3: Determinação das alterações nos níveis de cálcio intracelular após o tratamento com os peptídeos. (A) células B16F10-Nex2 foram incubadas com Fluo 4-NW e Probenecid (1 mM) em solução HBSS por 1 h a 37 °C. Após esse tempo de incorporação as células foram estimuladas com os peptídeos E12F (0,25 mM), L13S (0,5 mM) e E24G (1 mM) durante aproximadamente 20 min. A variação máxima de cálcio foi determinada por ionomicina e para o negativo o veículo (HBSS). (B) Células foram lavadas

com HBSS e incubadas com 2 μ M de Fura-2 AM, 1 mM de Pluronic e 1 mM de Probenecid. A variação do basal de cálcio foi quantificada em diferentes tempos (3, 6, 12 e 24 h) após os estímulos com os peptídeos E12F (0,25 mM), L13S (0,5 mM) e E24G (1 mM). A leitura de ambos experimentos foi realizada pelo leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices). O experimento foi realizado em triplicata.

CONCLUSÕES

Com os dados obtidos conclui-se que os peptídeos E12F, L13S e C9K apresentaram efeito inibitório na migração em baixas concentrações, sendo elas 0,125 mM, 0,50 mM e 0,50 mM, respectivamente. O peptídeo E12F apresentou efeito protetor *in vivo* no modelo metastático, uma vez os camundongos tratados com o mesmo apresentaram número de nódulos significativamente menores quando comparados aos camundongos não tratados. Os peptídeos também demonstraram resultados promissores no ensaio de alterações nos níveis de cálcio intracelular, uma vez que as células tratadas com esses peptídeos apresentaram nos primeiros vinte minutos um aumento nos níveis de cálcio. Entretanto, após 24h houve diminuição nos níveis basais de cálcio intracelular em células tratadas com os peptídeos, quando comparados com células não tratadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AROZARENA, L. *et al.* Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell*, 18;19(1):4557. 2011.

BONVIN, E.; SHAW, H.; DELMAS, V.; GODING, C. R. A phosphatidylinositol 3-kinasePax3 axis regulates Brn-2 expression in melanoma. *Mol Cell Biol*, 32(22):4674-83. 2012.

GOODALL, J. *et al.* Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by β -Catenin. *Molecular and Cellular Biology*, 2923-2931. 2004.

GOODALL, J. *et al.* The Brn-2 transcription factor links activated BRAF melanoma proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 2923-2931. 2004.

GOODALL, J; CARREIRA, S., *et al.* Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Res.*, 68(19):7788–94.). 2008.

AGRADECIMENTOS:

FAPESP, FAEP E UMC.