

RESUMO EXPANDIDO
XXVI Congresso de Iniciação Científica

ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DO PEPTÍDEO DERIVADO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO BRN2 EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Agnes Kobayashi Calvo de Sant'Ana¹

Maria Carolina Mariano Cesar²

Victória Santos Souza³

Fernanda Fernandes Miranda da Cunha⁴

Juliana Machado Anastácio⁵

Denise Costa Arruda⁶

1. Discente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail: agneskcsantana@gmail.com
2. Discente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail: cesarcarolina1@hotmail.com
3. Farmacêutica pela Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: victoriasouzabr@gmail.com
4. Doutora em Biotecnologia; e-mail: cunha.ffernandes@gmail.com
5. Discente Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail: julianamachado@hotmail.com
6. Docente da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: denisearruda@umc.br

Área de Conhecimento: Biologia Celular

Palavras-Chave: Melanoma; Peptídeo; Fator de Transcrição BRN2.

Como citar:

de Sant'Ana AKC, Cesar MCM, Souza VS, da Cunha FFM, Anastácio JM, Arruda DC. Estudo do efeito antitumoral do peptídeo derivado do fator de transcrição BRN2 em células de melanoma humano. Revista Científica UMC [Internet]. 27 de outubro de 2023; 8(2):e080200012.

Disponível em: <https://seer.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/1875>

Fluxo de revisão: o presente resumo expandido foi revisado por pares pela comissão do evento.

Recebido em: 11/09/2023

Aprovado em: 26/10/2023

ID publicação: e080200012

DOI:

Licença CC BY 4.0 DEED

INTRODUÇÃO

O melanoma é considerado o câncer de pele mais agressivo devido ao seu potencial metastático. Este tipo de câncer de pele, ocorre pela transformação maligna dos melanócitos que, devido a mutações, leva estas células desenvolverem diferentes capacidades funcionais, alterando o funcionamento dos mecanismos de proliferação, motilidade e sobrevivência (GRAY-SCHOPFER et al., 2007; OMS, 2020). A proteína BRN2 encontra-se expressa em melanócitos e superexpressa no melanoma, favorecendo a formação tumoral e proporcionando o desenvolvimento de metástase (GOODALL et al., 2004). Desta forma, compostos que consigam regular os níveis de BRN2, e conseqüentemente, outras proteínas reguladas por este fator de transcrição, seriam uma alternativa para o tratamento do melanoma (HARTMAN & CZYZ, 2015). O peptídeo E12F, derivado do fator de transcrição BRN2, apesar de não diminuir a viabilidade de células B16F10-Nex2, apresentou efeito inibitório da migração e invasão de células tratadas. Além disso, apresentou efeito protetor in vivo no modelo metastático sem toxicidade para os animais (dados não publicados). Com isso, este trabalho tem como objetivo, investigar o efeito antitumoral em células de melanoma humano SK-MEL-25 e A375, uma vez que, é visado o desenvolvimento de novas terapias para seres humanos.

OBJETIVO

Determinar o efeito antitumoral do peptídeo E12F, bem como, avaliar seu efeito nos mecanismos de migração e invasão celular em células de melanoma humano.

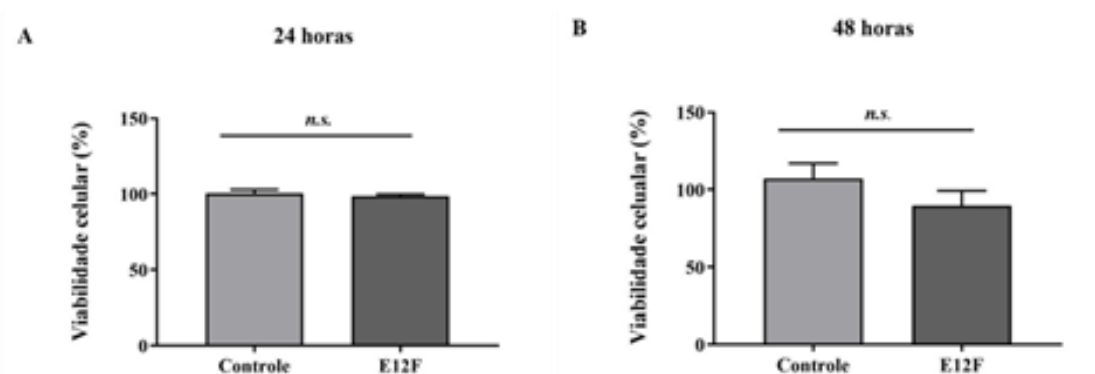
METODOLOGIA

A viabilidade celular foi estabelecida através do método de exclusão de *Trypan blue*, as células SK-MEL-25 e A375 foram tratadas com peptídeo E12F (1 mM) por 24 e 48 h. Em seguida, foi realizado o ensaio de migração celular por *Wound Healing*, as imagens foram capturadas nos tempos de 0, 24, 36 e 48 h em microscópio óptico. Para o ensaio de invasão celular, insertos *transwell* foram preparados com Matrigel. Células SK-MEL-25 foram adicionadas na câmara superior com E12F (0,75 mM), por fim, as células foram fixadas, permeabilizadas, coradas e as imagens foram capturadas e a contagem das células realizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como os resultados anteriores, em células de melanoma murino B16F10-Nex2 e ensaio *in vivo* foram promissores, neste trabalho, foi avaliado o efeito antitumoral do peptídeo E12F em células de melanoma humano SK-MEL-25 e A375, bem como, sua interferência nos processos de migração e invasão celular. Primeiramente, o peptídeo E12F foi testado em células de melanoma humano SK-MEL-25 por 24 e 48h em uma concentração de 1 mM. Neste ensaio, não houve diminuição da viabilidade celular em células tratadas com o peptídeo, quando comparadas as células não tratadas (Figura 1 A e B).

FIGURA 1 - Determinação do efeito do peptídeo E12F na viabilidade de células SK-MEL-25. Células SK-MEL-25 foram plaqueadas (5×10^3 e $2,5 \times 10^3$) e tratadas com peptídeo E12F 1 mM por (A) 24 e (B) 48 h. A viabilidade celular foi estabelecida pelo teste de exclusão de Trypan Blue.

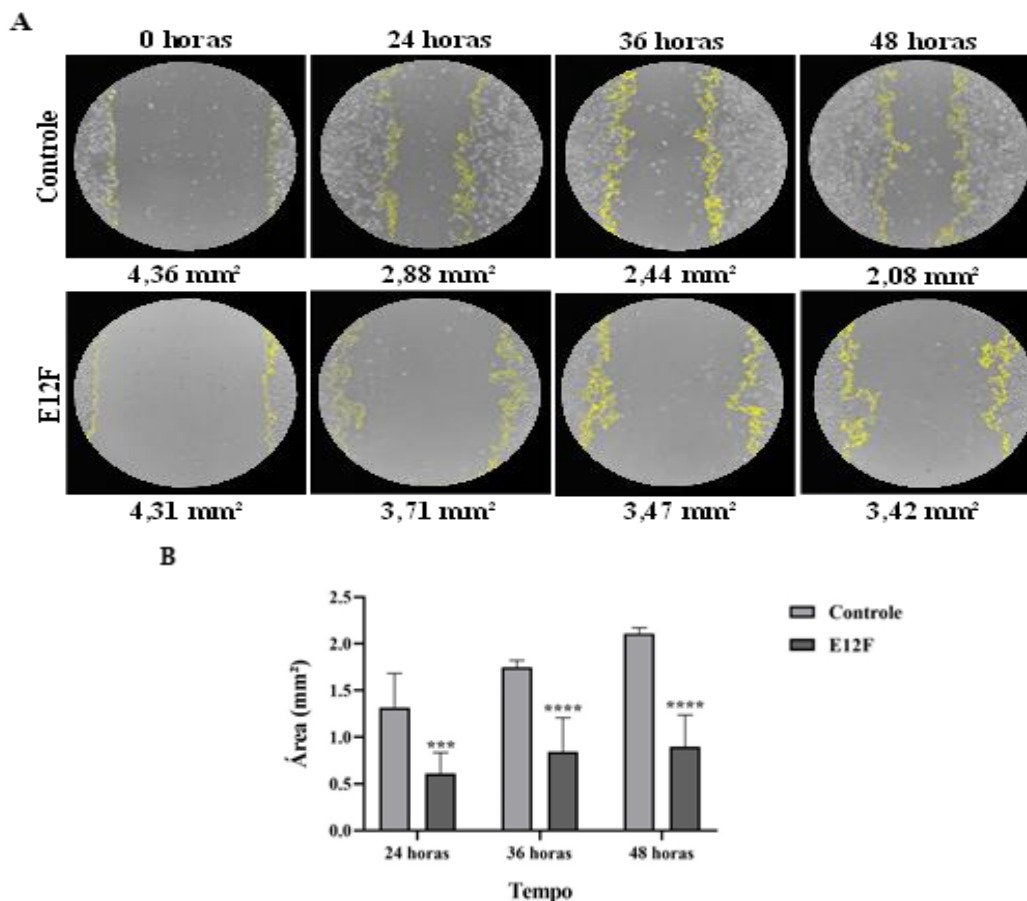


Como o peptídeo não apresentou diminuição da viabilidade celular em SK-MEL-25, em seguida, foi avaliado se ele poderia ter efeito nos mecanismos migração celular. Neste ensaio foi possível observar que, como demonstrado no gráfico abaixo (Figura 2B), o peptídeo E12F inibiu a migração celular, após 24, 36 e 48h de incubação. Foi observada uma diminuição da migração celular de 52%, 54% e 60%, respectivamente.

Como o peptídeo E12F apresentou efeito inibitório na migração celular, o próximo passo para a nossa pesquisa foi verificar se o peptídeo E12F também apresentaria efeito nos mecanismos de invasão celular. Após a contagem das células invasivas (Figura 3A), foi possível observar que as células tratadas com o peptídeo E12F foram 60% menos invasivas, quando comparadas a células não tratadas (Figura 3B).

FIGURA 2 - Determinação do efeito do peptídeo E12F na migração celular de células SK-MEL-25

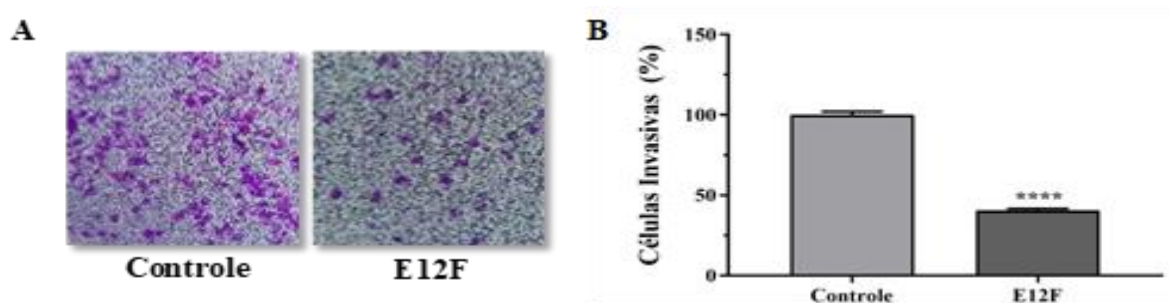
Células SK-MEL-25 ($1,5 \times 10^5$) foram plaqueadas e após 24 h, em seguida, as células foram tratadas (0,75 mM). (A) Imagens foram capturadas nos tempos de 0, 24, 36, 48 h, através de microscópio óptico invertido em um aumento de 200x. (B) Distância percorrida (mm^2) durante a migração celular. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.



Figueiredo e colaboradores (2016) elucidaram que, o peptídeo C36L1, derivado de regiões determinantes de complementaridade de uma imunoglobulina anti-vaccinia, inibe a migração e invasão celular através da despolimerização de microtúbulos em células de melanoma murino. Os mecanismos de migração e invasão celular são processos complexos que envolvem uma série de eventos coordenados e regulados por proteínas específicas. No melanoma, a proteína MITF (microphthalmia-associated transcription factor - fator de transcrição relacionado à microftalmia) está relacionada com esses mecanismos, pois regula negativamente genes relacionados à adesão celular e à matriz extracelular. Além disso, na literatura já foi elucidado que esta proteína, pode ser inversamente regulada pela expressão de BRN2, ou seja, níveis altos de BRN2 levariam a uma baixa expressão de MITF, acarretando no aumento de proteínas relacionadas a migração e invasão celular (GOODALL et al., 2008; HARTMAN & CZYZ, 2015; MULLER et al., 2014). À vista disso, futuramente a verificação da

expressão das proteínas relacionadas a migração e invasão celular, como MITF e caderinas serão realizadas por Western Blotting em células SK-MEL-25, para o melhor entendimento de como este peptídeo estaria inibindo os processos de migração e invasão.

FIGURA 3 - Determinação do efeito do peptídeo E12F na invasão celular de células SK-MEL-25. Os insertos transwell foram preparados com Matrigel. Células SK-MEL-25 ($2,5 \times 10^4$) foram adicionadas na câmara superior com meio DMEM e E12F (0,75 mM), para o tratado e o controle apenas células em meio DMEM. Em seguida, meio com 15% de SFB foi adicionado à câmara inferior. (A) As células foram fixadas, permeabilizadas, coradas e as imagens foram capturadas e a contagem das células realizada. (B) Representação gráfica das células invasivas contadas após 24h de tratamento. **** $p < 0,0001$.

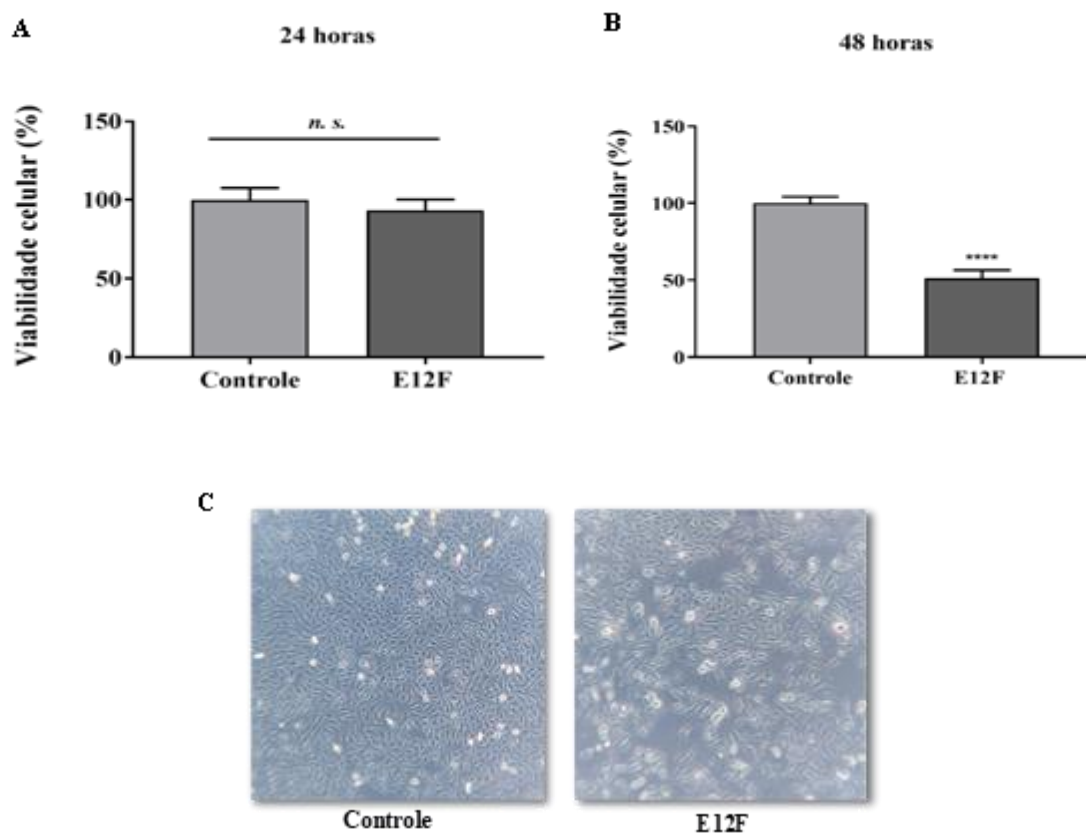


Em seguida, para verificar o efeito do peptídeo E12F considerando a variabilidade genética entre diferentes organismos de mesma espécie, o ensaio de viabilidade celular também foi realizado com células A375, que apresenta mutação BRAFV600E. Diferentemente do que ocorre com a linhagem celular SK-MEL-25, neste ensaio, foi possível observar que apesar do peptídeo (1 mM) não diminuir a viabilidade de células A375 após 24h (Figura 4A), diminuiu em cerca de 50% no tempo de 48h (Figura 4B), quando comparadas as células não tratadas. Além disso, ao corar as células no poço com Trypan Blue, não foi possível observar células mortas, mas um número menor de células tratadas, quando comparadas com células não tratadas (Figura 4C). Isto pode indicar que, a diminuição de células tratadas poderia estar relacionada à diminuição da proliferação.

Além de estar relacionado aos genes regulatórios dos mecanismos de migração e invasão, a proteína MITF também está relacionada a mecanismos de proliferação celular. Em células com BRAF mutado, o MITF encontra-se superexpresso devido a ativação constitutiva de ERK1 e apresentam um maior potencial proliferativo, devido a subregulação de p27, gene regulador da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Portanto, o fator de transcrição BRN2, ao regular a expressão de MITF, também pode regular, indiretamente, proteínas relacionadas ao ciclo celular (WELLBROCK et al., 2008; GOODALL et al., 2008).

Deste modo, futuramente a determinação do efeito antitumoral do peptídeo E12F em células A375 será realizada, através de ensaios de viabilidade celular na presença de inibidores de morte, para verificar se o peptídeo realmente não está induzindo morte celular. Além disso, será investigado a possível regulação no ciclo celular, bem como, a avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular por Western Blot. Por fim, também será realizado ensaio de clonogenicidade, para avaliar se o peptídeo poderia inibir a formação de colônias, indicando uma diminuição da proliferação.

FIGURA 4 - Determinação do efeito do peptídeo E12F na viabilidade celular de células A375. Células A375 foram plaqueadas (5×10^3 e $2,5 \times 10^3$) e tratadas com peptídeo E12F (1 mM) por (A) 24 e (B) 48 h. Imagens foram capturadas dos campos após 48h de tratamento (C). A viabilidade celular foi estabelecida pelo teste de exclusão de Trypan Blue. Este ensaio foi realizado em 3 experimentos independentes em triplicata. Análise estatística: teste t de Student. **** $p < 0,0001$



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em de melanoma humano SK-MEL-25, o peptídeo E12F apesar de não apresentar efeito na diminuição da viabilidade celular, demonstrou ter atividade inibitória dos mecanismos de migração e invasão, destas células. Em células de melanoma humano A375, o

peptídeo, em contrapartida, diminuiu a viabilidade celular, das células tratadas. Portanto, os resultados obtidos demonstram que o peptídeo E12F derivado do fator de transcrição BRN2 é promissor para novos estudos visando uma estratégia terapêutica específica contra o melanoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; AZEVEDO, R. A.; MASSAOKA, M. H.; GIROLA, N.; POLONELLI, L.; TRAVASSOS, L. R. A novel microtubule de-stabilizing complementarity-determining region C36L1 peptide displays antitumor activity against melanoma in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 1-17, 22 set. 2015
- GOODALL, J.; WELLBROCK, C.; DEXTER, T. J.; ROBERTS, K.; MARAIS, R.; GODING C. R. The BRN2 transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. *Molecular Cell Biology*. v. 24, n. 7, p. 2923-31, 2004.
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, v. 445, n. 7130, p. 851-857, fev. 2007.
- HARTMAN, M. L. & CZYZ, M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cellular and Molecular Life Science*. v. 72, p. 1249-1260. 2015.
- JAHANGIRI, B.; KHALAJ-KONDORI, M.; ASADOLLAHI, E.; DIZAJ, L. P.; SADEGHIZADEH, M. MSC-Derived exosomes suppress colorectal cancer cell proliferation and metastasis via miR-100/mTOR/miR-143 pathway. *International Journal Of Pharmaceutics*, v. 627, p. 122214, nov. 2022.
- OMS (2020) Skin cancers. World Health Organization. <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/>.
- WELLBROCK C., MARAIS R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol*. v. 170, p. 703-708, 2005.