

## DETERMINAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO E LOCALIZAÇÃO CELULAR DO PEPTÍDEO R18H DERIVADO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO BRN-2 EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

Raquel Tamires Soares Santos<sup>1</sup>; Fernanda Fernandes Miranda da Cunha<sup>2</sup>; Renato Arruda Mortara<sup>3</sup>; Luiz Rodolpho Travassos<sup>4</sup>; Denise Costa Arruda<sup>5</sup>

1. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: raquel.tamires.soares.santos@gmail.com
2. Doutoranda em Biotecnologia; e-mail: cunha.fernandes@gmail.com
3. Professor da Universidade Federal de São Paulo; ramortara@unifesp.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

Área de conhecimento: **Biologia Celular**

**Palavras-chaves:** Melanoma; internalização; endocitose; inibidores e peptídeo.

### INTRODUÇÃO

O melanoma é formado a partir de transformações malignas de melanócitos, células presentes na camada basal da epiderme, responsáveis pela produção de melanina. A formação do melanoma envolve as vias de sinalização MAPK, PI3K-Akt, Wnt/ $\beta$  catenina, que estão diretamente relacionadas à formação e ao desenvolvimento tumoral em células melanocíticas (GOODALL et al., 2008; WELLBROCK et al., 2008; COOK et al., 2008). Além disso, essas vias podem ativar o fator de transcrição Brn-2 que, apresenta-se expresso em melanócitos e superexpresso em células de melanoma. Peptídeos derivados de Brn-2 poderiam competir com o sítio de ligação original da proteína no DNA e desta forma induzir a morte celular (WELLBROCK et al., 2008). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que o peptídeo R18H possui atividade antitumoral em células de melanoma murino B16F10-Nex2 e o mecanismo de morte celular induzido por esse peptídeo é apoptose (Dissertação de mestrado Cunha, 2017). O objetivo desse trabalho foi investigar os mecanismos de internalização, bem como, a localização intracelular do peptídeo R18H. Os mecanismos de internalização celular podem ser classificados em dois grupos, fagocíticos e pinocíticos (MORROW et al., 2002). O grupo pinocítico pode ser subdividido em macropinocitose, endocitose, mediada por clatrina, endocitose mediada por cavéolas e endocitose independente de clatrina e cavéolas (FERREIRA et al., 2014). Esses mecanismos podem ser identificados com inibidores dessas vias de internalização, como amilorida (RADAIC et al., 2016), nocodazol, (BAYER et al., 1998; FERREIRA et al., 2014), metil- $\beta$ -ciclodextrina (RADAIC et al., 2016) e tampão de depleção de potássio (RADAIC et al., 2016). A internalização celular pode ocorrer de diferentes maneiras, sendo por muitas vezes o mecanismo de internalização não elucidado completamente, devido a sua complexidade e por existirem mecanismos de endocitose independentes das vias clássicas.

### OBJETIVO

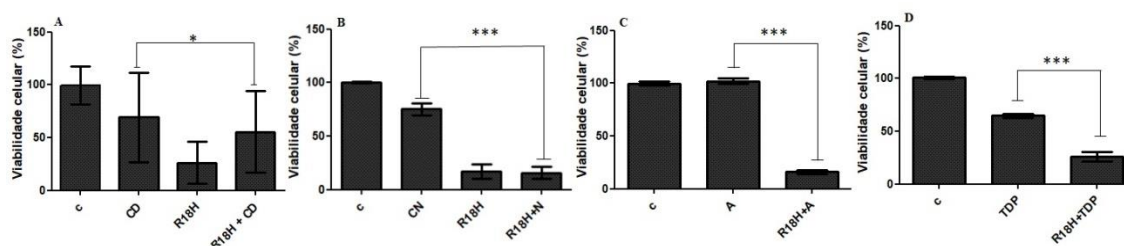
Determinação da internalização e localização celular do peptídeo R18H, derivado do fator de transcrição Brn-2.

## MÉTODOS

Para determinação do mecanismo de internalização celular, células B16F10-Nex2, foram pré-incubadas, por 1 h com os inibidores de cavéolas (metil  $\beta$ -ciclodextrina), polimerização dos microtúbulos (nocodazol), macropinocitose por bomba de prótons (amilorida), clatrina (tampão de depleção de potássio) e tratadas por 3 h com 1 mM do peptídeo. Após o período de tratamento a viabilidade celular foi determinada por ensaio com o corante de exclusão Trypan Blue. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. Para o ensaio de microscopia eletrônica, as células foram cultivadas em garrafa e tratadas com 0,5 mM do peptídeo overnight, posteriormente fixadas com glutaraldeído, incluídas em resina Epon e foram confeccionadas telas para leitura em microscópio eletrônico de transmissão. Para a determinação da internalização celular as células foram tratadas com o peptídeo biotilado nas concentrações de 0,12 e 0,25 mM por 24 e 48h e posteriormente foram incubadas com tampão de imunofluorescência e coradas com Estreptavidina-AlexaFluor 488, Faloidina-rodamina e DAPI. As células foram analisadas em microscópio confocal e as imagens foram processadas utilizando o ImageJ.

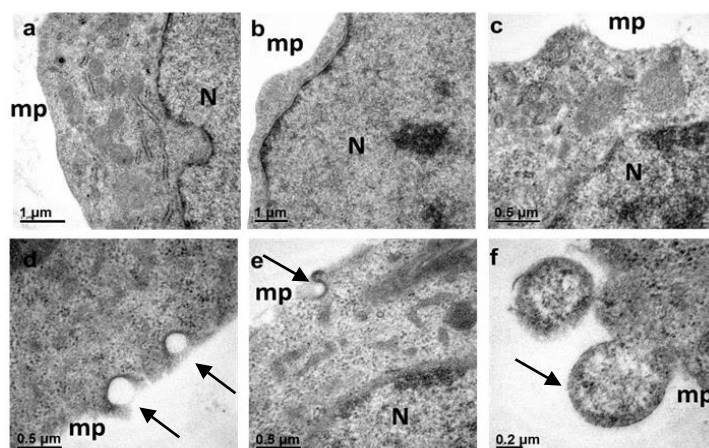
## RESULTADOS/DISCUSSÃO

Em experimentos anteriores realizados no laboratório o peptídeo R18H mostrou atividade citotóxica in vitro em células B16F10-Nex2 após o tratamento por 2 e 4 hs, sendo que a EC50 calculada foi de 0,663 e 0,589 mM, respectivamente. Além disso, camundongos tratados com o peptídeo, demonstraram uma redução do número de nódulos pulmonares em relação a camundongos não tratados, demonstrando atividade antitumoral in vivo. No entanto, ainda não se sabia se o peptídeo era internalizado e o seu mecanismo de endocitose. Para verificação do mecanismo de internalização, as células foram incubadas com o peptídeo na presença de inibidores de internalização. As células foram incubadas com peptídeo na presença dos inibidores de cavéolas (metil- $\beta$ -ciclodextrina) clatrina (tampão de depleção de potássio), macropinocitose por bomba de prótons (amilorida) e polimerização dos microtúbulos (nocodazol) (Fig. 1). Pudemos observar que o peptídeo apresentou atividade antitumoral na presença dos inibidores utilizados. O mecanismo de internalização não foi elucidado e possivelmente o peptídeo esteja sendo endocitado por um mecanismo independente das vias clássicas de internalização.



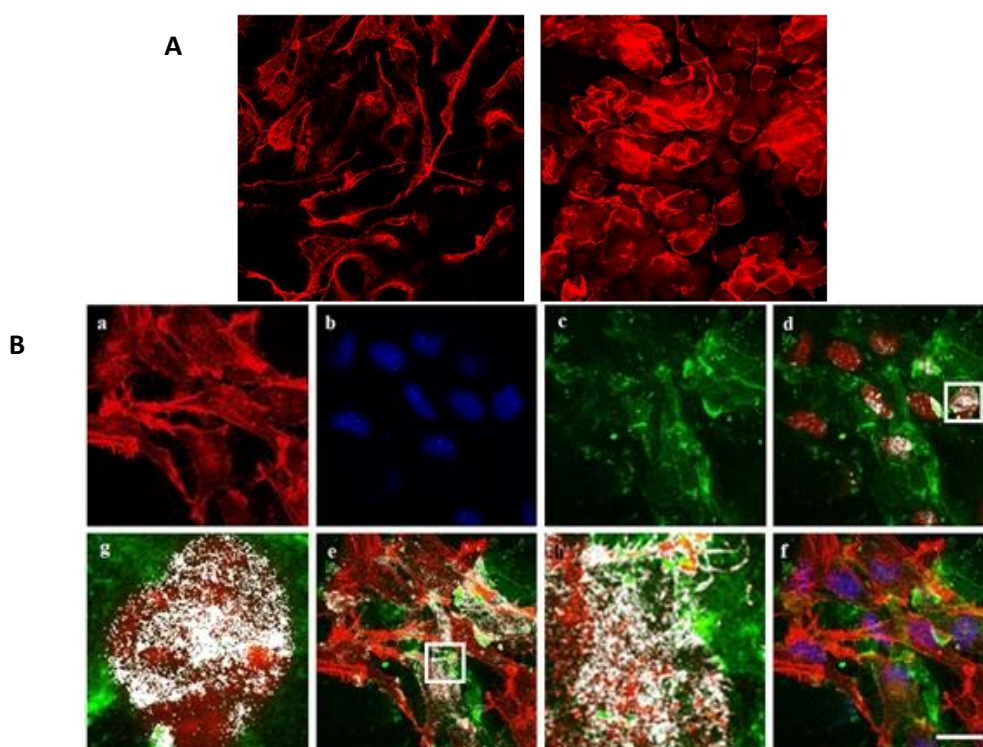
**Figura 1:** Estudo da internalização celular do peptídeo R18H na presença de inibidores de endocitose. As células B16F10Nex-2 foram plaqueadas ( $5 \times 10^3$ ) e pré-incubadas com os inibidores (A) metil- $\beta$ -ciclodextrina, (B) Nocodazol, (C) amilorida e (D) tampão de depleção de potássio por uma 1 hora, posteriormente tratadas com 1 mM do peptídeo por 3 horas e células não tratadas (c). \*\*\*  $p < 0,001$  \*  $p < 0,05$ . A viabilidade foi determinada pelo método de contagem com o corante exclusão Trypan Blue.

Além disso, também foram realizados experimentos de microscopia eletrônica de transmissão (MET), onde foi possível observar a formação de vesículas de endocitose e exocitose em células tratadas com o peptídeo em relação a células não tratadas, sugerindo sua internalização celular (Fig. 2).



**Figura 2:** Microscopia eletrônica de transmissão. Células B16F10Nex-2 foram cultivadas em garrafas e tratadas com 0,5 mM do peptídeo R18H, overnight e posteriormente fixadas com glutaraldeído e incluídas em resina epon e foram realizados cortes ultrafinos e observadas em MET. (a, b, c) células não tratadas e (d, e, f) células tratadas, (mp) membrana plasmática e (N) núcleo. Setas pretas mostram vesículas de internalização (d, e) e exocitose (f).

Além disso, ainda foram realizados experimentos após 48 h de tratamento e a actina das células foi observada por microscopia confocal, e os resultados demonstram que o peptídeo interfere na morfologia da actina, indicando um possível mecanismo de ação do peptídeo (Fig 3A). Para a determinação da internalização também foram feitos experimentos de microscopia confocal com o peptídeo biotilado e os resultados indicam que o peptídeo está sendo internalizado, uma vez que apresentou pontos de colocalização com o núcleo e a actina, em diferentes planos focais das células. Esses resultados indicam que o peptídeo localiza-se no núcleo e na actina (Fig. 3B).



**Figura 3:** Microscopia Confocal. As células B16F10-Nex2 foram plaqueadas em lamínulas e tratadas com (A) 0,12 mM do peptídeo biotilado por 48h e (B) 0,25 mM do peptídeo biotilado por 24h. (A) As células não tratadas (a) e células tratadas (b) foram coradas com Faloidina-rodamina e observadas no microscópio confocal. (B) As células foram coradas com Faloidina-rodamina (a), DAPI (b) e Estreptavidina Alexa Fluor 488 (c) e foram analisadas por microscopia confocal. Em (d) Pontos de colocalização do peptídeo com o núcleo; (e) pontos de colocalização do peptídeo e actina; e (g) e (h) aumento de 6 X das regiões indicadas em quadrados brancos (f) Merge; Barra de 20  $\mu$ M.

## CONCLUSÃO

Os experimentos de MET demonstram a formação de vesículas de endocitose e exocitose. Os experimentos de microscopia confocal indicam que o peptídeo é internalizado e se liga no núcleo e na actina. O mecanismo de internalização ainda é desconhecido, uma vez que o peptídeo apresentou atividade antitumoral na presença dos inibidores de internalização, indicando outro mecanismo de endocitose. Devido a ligação no núcleo e actina acredita-se que o peptídeo internalize por um mecanismo de endocitose independente das vias clássicas e que este interage com citoesqueleto de actina, podendo estar dessa forma envolvida com o mecanismo de ação do peptídeo.

## REFERÊNCIAS

- BAYER N, et al., Effect of Bafilomycin A1 and Nocodazole on Endocytic Transport in HeLa Cells: Implications for Viral Uncoating and Infection. *Journal of Virology*. 1998;72(12):9645-9655.
- BERTOLOTTO, C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica*, ID: 635203, 22págs. 2013.
- COOK, A. L. et al. BRN2 in melanocytic cell development, differentiation, and transformation. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 149-167. 2008.
- CUNHA, F. F. M. Estudo da atividade antitumoral do peptídeo R18H derivado do fator de transcrição Brn-2 em células de melanoma murino e determinação do mecanismo de morte celular. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP. 2017.
- FERREIRA, L. A. B.; et al. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. v. 3, n. 2, p. 143-154. 2014.
- GOODALL, J. et al. The Brn-2 Transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 2923-2931. 2008.
- MORROW, I. C et al., Flotillin-1/Reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel Golgi-independent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 277, n. 50, p. 48834-48841. 2002.
- RADAIC, A.; PUGLIESE, GUSTAVO O. et al., Studying the interactions and biological systems. *Quimica Nova* vol.39- SP-2016
- 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