

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO PEPTÍDEO C15D DERIVADO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO BRN-2 EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10-NEX2

Juliana Machado Anastácio¹; Fernanda F. Miranda da Cunha²; Denise Costa Arruda³

1. Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: juliiana_machado@hotmail.com
2. Doutoranda em Biotecnologia; e-mail: cunha.ffernandes@gmail.com
3. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: denisearruda@umc.br

Área de conhecimento: **biotecnologia; biologia celular e molecular.**

Palavras-chaves: Melanoma; Brn-2; peptídeo; efeito antitumoral.

INTRODUÇÃO

O melanoma é o câncer de pele originado a partir de acúmulo de mutações genéticas em melanócitos (LIN e FISHER, 2007). Mutações podem modificar a expressão de genes que codificam proteínas intrínsecas às vias reguladora, cuja função é o controle da proliferação celular, dos fatores de crescimento, da adesão celular e mecanismos de morte (SMITH et al., 2002; SCHATTON e FRANK, 2008). Brn-2 é um fator de transcrição que está relacionado com o desenvolvimento de melanócitos, porém encontra-se superexpresso no melanoma (BESCH e BERKING, 2014). Estudos em nosso laboratório mostraram que peptídeos derivados de fatores de transcrição podem ter efeitos na inibição da migração e invasão celular, interferir no ciclo celular, bem como podem induzir morte celular.

OBJETIVOS

Determinar a atividade antitumoral in vitro do peptídeo C15D, derivado do fator de transcrição Brn-2, em células de melanoma murino B16F10-Nex2, bem como, determinar o mecanismo de morte celular e o efeito inibitório na migração das células. Tendo também como objetivos específicos:

- Testar viabilidade celular em células tratadas com o peptídeo C15D, bem como na presença de inibidores de morte e ROS;
- Determinar efeito do C15D na migração celular, na hemólise em eritrócitos humanos e nos níveis de Ca^{2+} intracelular;
- Determinar efeitos do peptídeo na permeabilização da membrana plasmática, degradação do DNA e do aumento dos níveis de ânion superóxido em células tratadas com o peptídeo.

METODOLOGIA

Células de melanoma murino B16F10-Nex2 foram tratadas com diversas concentrações de C15D por 24 e 48 horas; as células foram contadas com o corante de exclusão Tripán Blue na câmara de Neubauer. Para verificar se o peptídeo C15D induz morte celular, células foram pré-incubadas com inibidores de necroptose (necrostatina), de ROS (N-acetil L-cisteína), de caspase (Z-VAD) e de autofagia (3-Metiladenina) e depois foram tratadas com 1mM do peptídeo por 24 horas, em câmara de Neubauer. O aumento nos níveis de ânion superóxido foi testado em células incubadas com diidroxietídio (DHE) que na presença de ânion superóxido é convertido em etídio que marca o núcleo das células e emite fluorescência vermelha. Foi realizado o ensaio de TUNEL para determinar se há degradação do DNA em células de melanoma murino tratadas com 1,0 mM do peptídeo. Para a determinação da

permeabilização da membrana em células tratadas com 1 mM de C15D, as células vivas foram marcadas com PI (iodeto de propídio), que é internalizado em células com a membrana permeável e, desta forma, cora o núcleo em vermelho. Para determinar a migração celular, foram feitas lesões verticais e as células foram incubadas com 0,5 mM do peptídeo, foram tiradas fotografias de 0, 2, 4 e 24 h para analisar a distância percorrida pelas células. Para determinar se o peptídeo era capaz de induzir hemólise, eritrócitos humanos receberam tratamento com o peptídeo C15D por 30 minutos e depois foi analisada a absorbância em um espectrofotômetro à 540 nm.

RESULTADOS/DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular demonstraram diminuição da viabilidade de 34% em células tratadas com 0,75 mM e 48% com 1 mM do peptídeo por 24h quando comparadas às células não tratadas (Figura 1A), enquanto no tratamento em 48 h diminuiu 31% com 0,75 mM e 42% com 1 mM (Figura 1B). Não foi possível determinar o mecanismo de morte celular, pois o peptídeo não perdeu seu efeito na presença de nenhum dos inibidores utilizados, não induziu a degradação do DNA e permeabilização da membrana plasmática. Comparado ao controle, as células tratadas com o peptídeo apresentaram aumento dos níveis de ânion superóxido. Entretanto, na presença de NAC, um inibidor de espécies reativas de oxigênio (ROS), C15D manteve seu efeito. Portanto o aumento do nível de ânion superóxido pode ser devido estresse indireto causado pelo tratamento do peptídeo. Na concentração de 0,5 mM o peptídeo apresentou efeito inibitório significativo na migração celular; as células tratadas migraram em média 0,11 mm enquanto as células não tratadas migraram 0,22 mm (Figura 2B). As células tratadas com C15D não apresentaram diferenças no nível de Cálcio intracelular (Figura 3). Além disso, o peptídeo não induziu hemólise em hemácias humanas.

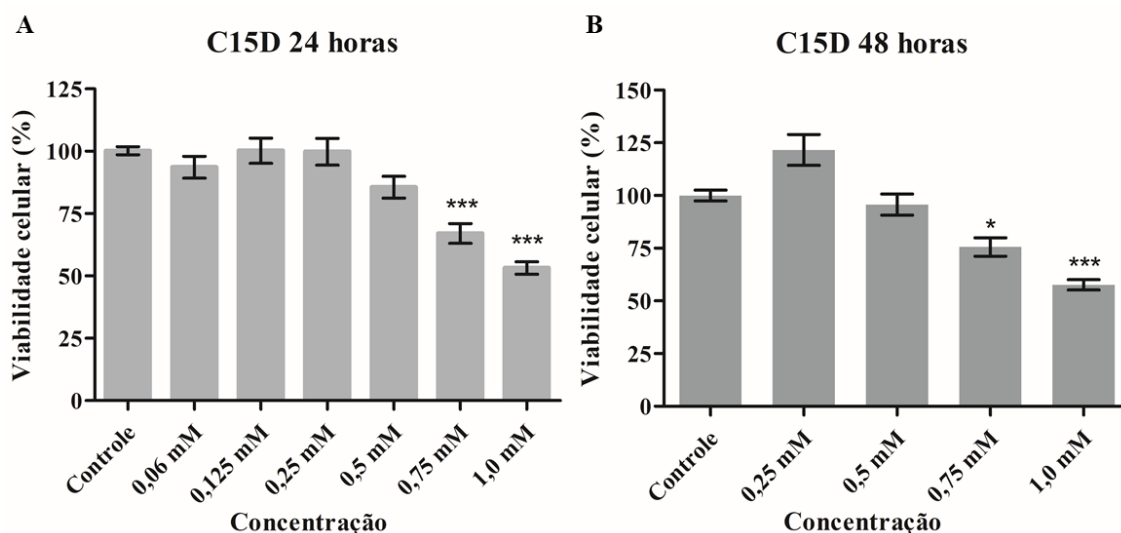


Figura 1: Determinação da viabilidade celular *in vitro* de células incubadas com o peptídeo C15D. Células B16F10-Nex2 (5×10^3 /poço, placas de 96 poços) incubadas com o peptídeo C15D nas concentrações 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mM por 24 horas (A) e 48 horas (B), a 37° C, 5% CO₂. Células não tratadas (controle) foram incubadas na ausência do peptídeo com meio RPMI e 1% de DMSO. A viabilidade celular foi determinada com corante de exclusão Trypan Blue. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Foram realizados em triplicata três experimentos independentes para analisar a viabilidade celular em 24 horas e 2 experimentos independentes para o ensaio de 48 horas.

Figura 2: Determinação dos efeitos inibitórios na migração celular induzida pelo peptídeo C15D. **(A)** Em uma placa de 12 poços foram plaqueadas células B16F10-Nex2 (3×10^5) e após 24 horas, foram feitas lesões verticais. As células foram tratadas com 0,5 mM do peptídeo C15D por 24 horas. **(A)** As imagens são representativas apenas de um experimento. **(B)** O gráfico representa a média da distância percorrida em milímetros pelas células de três experimentos independentes, em triplicata. $*p < 0,05$.

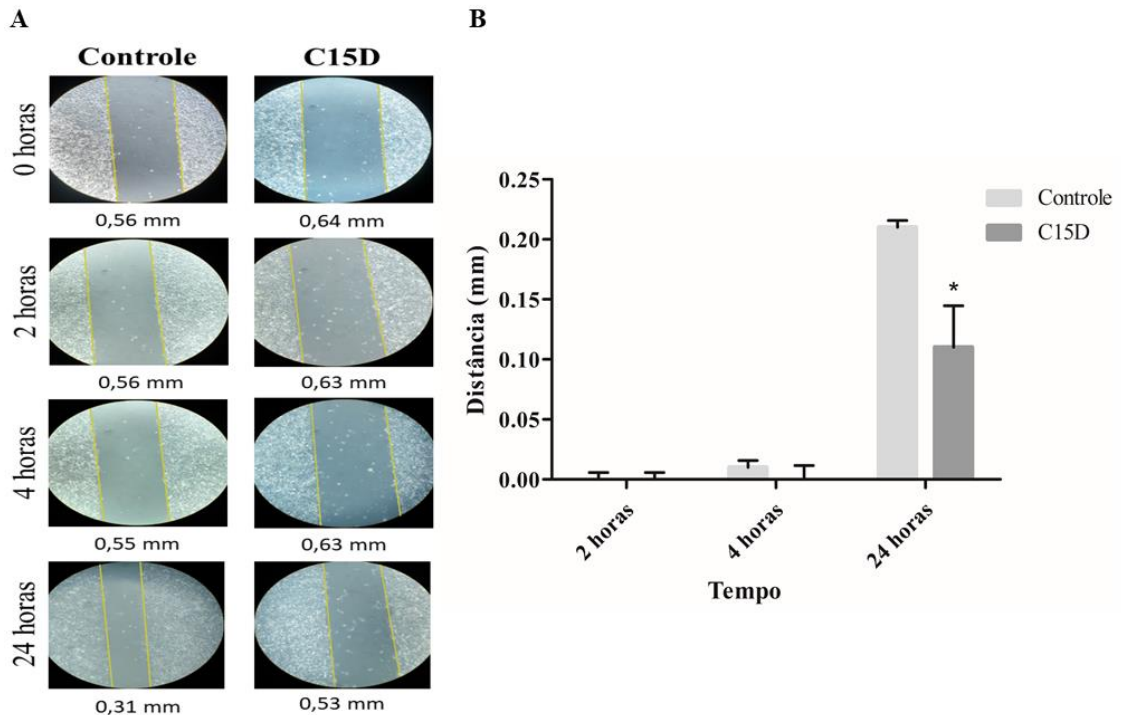
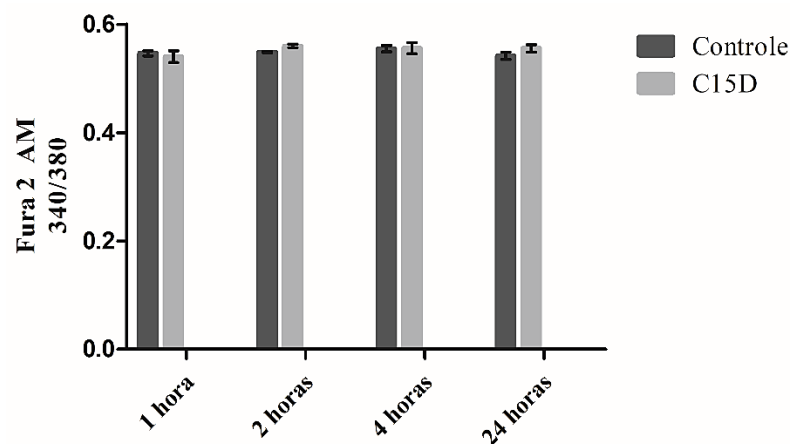


Figura 3: Determinação dos níveis de cálcio utilizando Fura-2. B16F10-Nex2 foram tratadas com 1 mM do peptídeo C15D e posteriormente incubadas com 2 mM de Fura-2 AM + Probenicid 1 μ M + 0,01% Pluronic. O Ca^{2+} foi medido utilizando o leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices) com o SoftMax Pro Software nos tempos de 1; 2; 4; 24h, em leituras end point. Fura-2 foi estimulado em dois comprimentos de onda (340 – 510 nm; 380 – 510 nm) e a luz de emissão foi detectada a $\lambda_{Em} = 510$ nm. $*p < 0,05$.



CONCLUSÕES

O peptídeo C15D apresenta atividade antitumoral em células de melanoma murino B16F10-Nex2, entretanto não foi possível detectar o mecanismo de morte celular induzido pela droga. O peptídeo não interferiu nos níveis de cálcio intracelular e não induziu hemólise em eritrócitos humanos. Além disso, C15D apresentou efeito inibitório significativo na migração celular. Outros estudos serão realizados para determinar o mecanismo de ação deste peptídeo, como análise do ciclo celular e invasão.

REFERÊNCIAS

BESCH, R.; BERKING, C. POU transcription factors in melanocytes and melanoma. **Eur J Cell Biol.** v. 93, v. 1-2, p. 55-60, 2014.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature.** v. 445, p. 843-50, 2007.

SCHATTON, T.; FRANK, M.H. Cancer stem cells and human malignant melanoma. Pigment Cell and Melanoma Research. **La Jolla**, v. 21, n. 1, p. 39-55, 2008.

SMITH, S.H.; GOLDSCHMIDT, M.H; MCMANUS, P. M. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. **Vet Pathol.** v. 39, n. 6 p. 651-678, 2002.