



Relatório Científico

Efeitos da exposição a sequências de frequências sobre a internalização de receptores EGFR em células A549 de carcinoma pulmonar humano

Dr. Paulo Peitl Júnior

1. Introdução

Os contínuos desenvolvimentos técnicos e tecnológicos proporcionaram a descobertas de diversos marcadores que representam a chave para o desenvolvimento da chamada terapia molecular ou terapia alvo, que é considerada uma nova estratégia na medicina oncológica, suplementando a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia tradicional. Entre os inúmeros candidatos a marcadores moleculares descritos na literatura, o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) é um dos mais interessantes. Quando o EGFR é ativado por sua proteína efetora EGF, o conjunto EGF+EGFR é internalizado para o citoplasma celular e sido identificado como um evento iniciador da cascata de sinalização intracelular levando à proliferação, sobrevivência, angiogênese e metastatização em quase um terço de todos os tumores humanos. A partir dessas características, inúmeros estudos foram motivados na tentativa de bloquear a ativação do EGFR e, conseqüentemente, inibir a proliferação das células neoplásicas.

Nos últimos anos, a terapia dirigida contra EGFR tornou-se realidade com o desenvolvimento de diversas drogas intencionado a inibição de sua via metabólica. Iressa (gefitinib), Tarceva (Erlotinib), Tykerb (lapatinib), Nerlynx (Neratinib), Tagrisso (Osinertinib) são exemplos de fármacos quimioterápicos que movimentam grandes montantes na indústria farmacêutica atualmente. Vale ressaltar que esse alvo metabólico também figura entre os mais avançados no desenvolvimento de fármacos baseados em anticorpos, a chamada Imunoterapia. Alguns já estão disponíveis no mercado, como o Erbitux (Cetuximab) e o Vectbix (Panitumumab), entre outros, e outros encontram-se em ensaios pré-clínicos com resultados promissores. Embora essa nova classe de tratamento tenha apresentado bastante eficiência no tratamento de diversos tumores, tais fármacos apresentam alguns desafios e limitações para sua aplicação e abrangência. Os elevados custos de produção e as restrições inerentes aos anticorpos monoclonais, como a ativação do sistema imune e relativa limitação da utilização, proporcionam grande relevância aos estudos e desenvolvimentos de novas alternativas de interferência da importante via metabólica do EGFR.

Nesse contexto, estudos com células tumorais cultivadas *in vitro* com receptores modificados com incorporação de moléculas fluorescentes em sua estrutura possibilitam o rastreamento da eficiência de sua ativação. Para a rápida detecção de múltiplas estruturas associadas a moléculas fluorescentes presentes nas células, é possível utilizar a metodologia de triagem em larga escala (*High Content Screening*, HCS). Essa metodologia permite obter dados com maior relevância biológica, uma vez que favorecem a visualização integrada de moléculas e/ou diferentes vias a níveis celulares. A aquisição e análise das imagens normalmente são realizadas com o auxílio de *softwares* chamados módulos de análise. O método de identificação consiste na utilização de algoritmos matemáticos

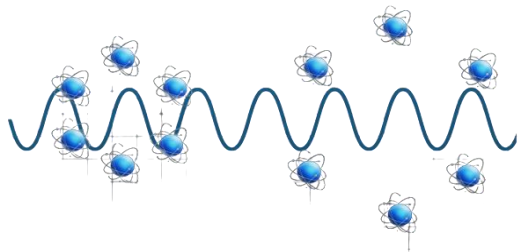
para reconhecer padrões biológicos presentes nas imagens a partir de parâmetros determinados pelo experimentador. Portanto, a utilização de ferramentas moleculares para análise intracelular associadas ao alto poder de resolução e da capacidade de gerar dados propiciados pela metodologia de HCS representam um grande avanço para o desenvolvimento de novas metodologias de tratamento oncológico, sendo de importante aplicação para o desenvolvimento de projetos com alvos grande relevância como a via metabólica de EGFR.

2. Tecnologia com Aplicação de Frequências

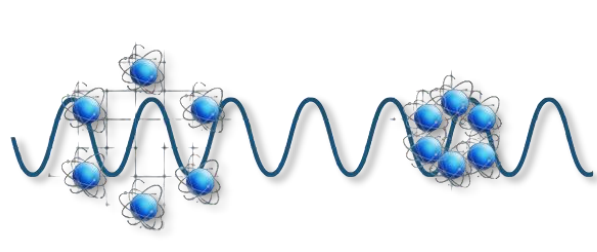
O uso de sequências de frequências extremamente baixas, inofensivas aos seres humanos e ao meio ambiente, tipicamente encontradas na natureza, é capaz de aumentar ou diminuir o espaço inter atômico de um determinado conjunto de átomos, alterando suas as propriedades físico-químicas e/ou biológicas.

O ajuste feito leva as substâncias a melhorarem parâmetros, como o rendimento de velocidade, dos processos físicos e químicos nos quais eles estão envolvidos.

Tratamento para AUMENTO do espaço inter atômico



Tratamento para REDUÇÃO do espaço inter atômico



Aplicação de sequências de frequências, as quais são projetadas por meio de um algoritmo proprietário faz os ajustes na distância entre os átomos das moléculas a serem tratadas (ALVOS), podendo estas moléculas serem compostas de sequências químicas, aminoácidos ou nucleotídeos.

3. Objetivos

Avaliar a internalização de receptores EGFR em células A549 após exposição à frequência.

4. Material e métodos

a) Cultivo celular

Foram utilizadas células de linhagem A549 (CLL1097, Sigma-Aldrich), as quais consistem em células de carcinoma pulmonar humano com biossensor SH2 associado à proteína verde fluorescente (GFP). As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³ com 20 mL de meio de cultura DMEN (#11965-092, Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF - #10270106, Gibco) (DMEN 10%).

Para o desenvolvimento experimental, o sobrenadante da garrafa de cultura foi descartado, seguido por lavagem com 5 mL de PBS 1x (#10010023, Gibco) aquecido. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tripsina, um agente quelante, para coletar as células aderidas. A inibição da atividade da tripsina foi realizada através da adição de 9 mL de meio DMEN 10%. As células foram transferidas para um tubo, homogeneizadas, quantificadas em câmara de Neubauer e centrifugadas a 200 x g durante 5 minutos. As células foram semeadas em 50 poços na concentração de 15.000 células/poço em duas placas de 96 poços com bordas pretas e fundos transparentes (#3603, Corning). Para a posterior identificação do núcleo celular, o reagente Hoechst 33342 foi adicionado às células na concentração de 2 µg/µL. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C e 5% CO² no volume final de 150 µL de DMEN 10%, por 24 horas.

b) Seleção da região para interferência com frequência

Baseado em estudos da estrutura cristalográfica da proteína EGFR, depositados no *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), duas regiões do domínio extracelular do receptor EGFR foram selecionadas para o desenvolvimento da frequência (Figura 1).

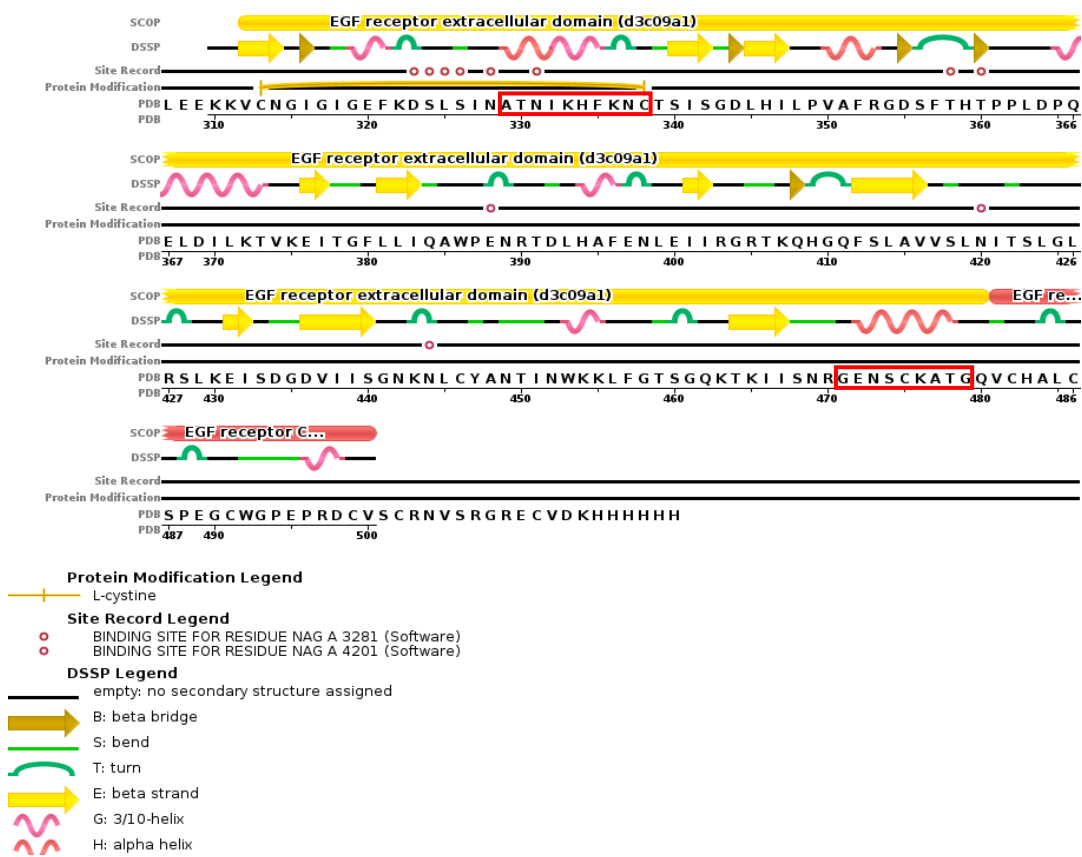


Figura 1 – Sequência do domínio extracelular do receptor EGFR. As caixas em vermelho destacam as regiões selecionadas para interferência. Informações disponíveis no Protein Data Bank <<https://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=3C09>>, acessado em 10 de dezembro de 2018.

As sequências de aminoácidos selecionadas foram usadas como “ALVO” para o algoritmo exclusivo EFFATHA calcular quais as sequências de frequências deveriam ser aplicadas com a finalidade de REDUZIR o espaço inter atômico entre os átomos que compõe este conjunto de aminoácidos.

c) Exposição de frequência na cultura celular

Após 24 horas de adesão celular, uma placa de cultura celular foi exposta durante 1 hora à frequência desenvolvida para interferir em duas regiões do domínio extracelular de EGFR, conforme descrito anteriormente. Para isso, foi utilizado um “device” fornecido pela empresa

EFFATHA, que foi fixado na superfície inferior da placa com auxílio de fitas adesivas e incubados separadamente em estufa a 37°C, 5% de CO₂.

d) Ativação do receptor EGFR

A ativação do receptor para desencadear a internalização foi realizada por meio de tratamento das células com seu ligante (efetor), a proteína EGF. Para isso, foi preparada uma solução contendo DMEN 10% e EGF 50 ng/mL (E3476, Life Technologies). O sobrenadante das células foi aspirado e, em seguida, adicionou-se 100 µL de solução/poço. Logo após a adição do tratamento, iniciou-se a aquisição das imagens. Essas etapas foram realizadas para ambas as condições controle e exposta às frequências.

e) Aquisição e análise de imagens pelo sistema de *High-Content Screening* (HCS)

Imagens das amostras foram adquiridas no equipamento ImageXpress Micro XLS System (Molecular Devices), em seis campos centrais de cada poço, em aumento de 40x. Para a aquisição de imagens dos núcleos foi utilizado o filtro DAPI (λ_{ex} : 377 e λ_{em} : 447) e para o receptor EGFR internalizado expressando GFP, o filtro FITC (λ_{ex} : 482 e λ_{em} : 536). As imagens foram adquiridas em intervalos de 2 minutos e 30 segundos, durante 30 minutos. Apenas durante a aquisição da placa exposta, o cartão fixado abaixo da mesma era transferido para a tampa. O efeito da frequência foi avaliado após 1 hora de exposição. Para quantificar os receptores internalizados, as imagens foram segmentadas de acordo com parâmetros de tamanho e intensidade das estruturas de interesse através do *software* MetaXpress (versão 5.3.0.5, Molecular Devices).

5. Desenho Experimental

Como descrito anteriormente, duas placas experimentais foram preparadas, das quais uma foi exposta à frequências e a outra utilizada como controle (sem exposição). Após 24 horas de incubação para aderência celular, três amostras da placa controle foram ativadas com EGF. Como controle negativo da ativação, os sobrenadantes celulares de outras três amostras da mesma placa foram substituídos por um novo. Em seguida, a placa foi encaminhada para aquisição de imagens, como descrito anteriormente (tópico 3.e). Ao finalizar a aquisição da placa controle, as mesmas etapas foram realizadas com amostras da placa exposta à frequência por 1 hora (Figura 2). Os valores obtidos são resultado de triplicatas experimentais.

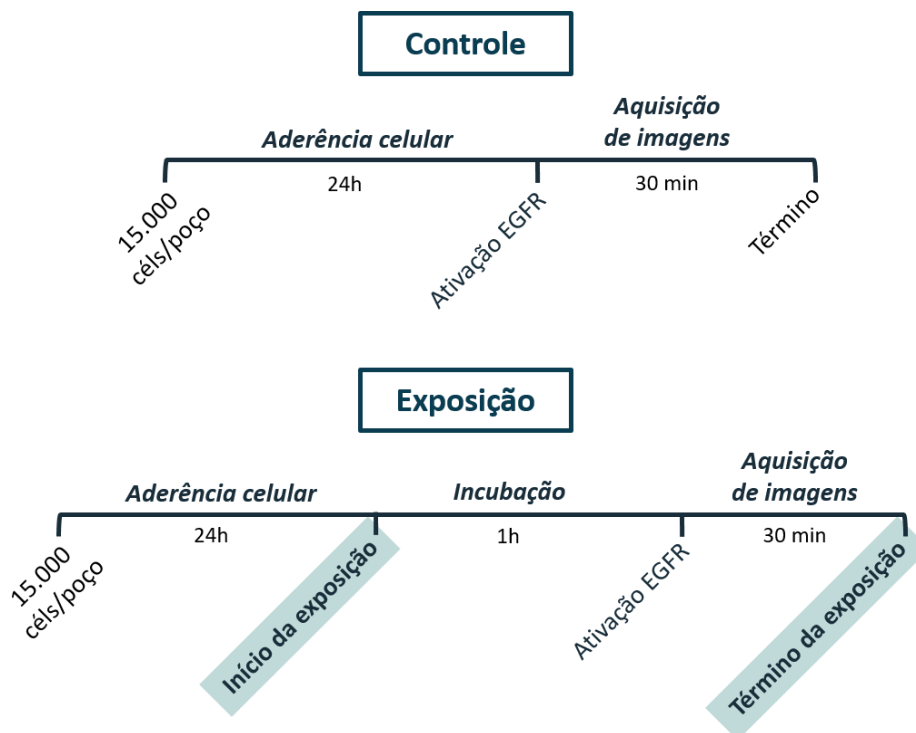


Figura 2 – Desenho experimental para exposição à frequência e aquisição de imagens. Representação da ordem de eventos realizados para tratamentos e aquisição de imagens das placas controle (sem exposição) e com exposição à frequência.

6. Resultados

Inicialmente foram adquiridas as imagens de ambas as placas após 1 hora de exposição à frequência. Ao longo de trinta minutos, observou-se o aumento progressivo do número de receptores EGFR internalizados nas células tratadas com o ligante EGF (Figura 3A). Para quantificar o número de receptores internalizados em cada condição experimental, as imagens obtidas foram segmentadas com o auxílio do *software* MetaXpress (versão 5.3.0.5, Molecular Devices), para a identificação de núcleos celulares e dos receptores internalizados (Figura 3B).

A exposição à frequência por uma hora apresentou redução estatisticamente significativa do número de receptores internalizados em relação ao controle não exposto (Figura 4A). Após sete minutos de ativação dos receptores com EGF, as células controle apresentaram, aproximadamente, quatro receptores internalizados. Diferentemente, as células expostas à frequência apresentaram redução de internalizações correspondendo, em média, a dois receptores internalizados.

A diferença significativa do número de receptores pôde ser observada até 25 minutos após a ativação com EGF.

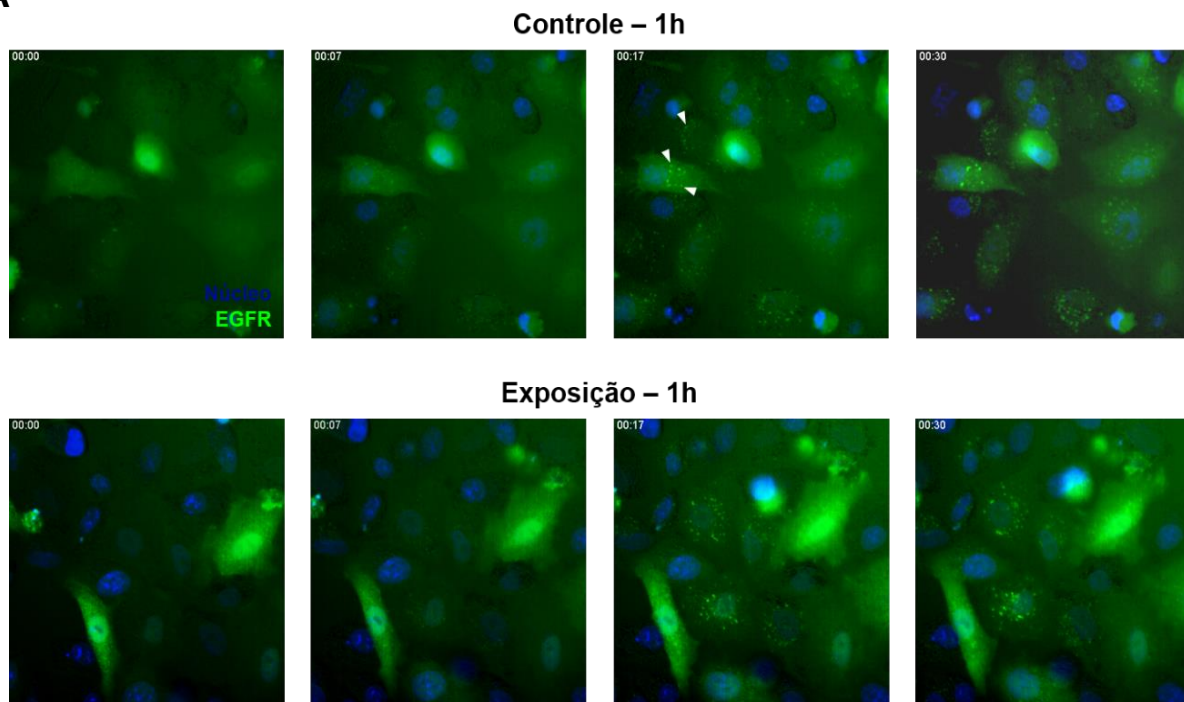
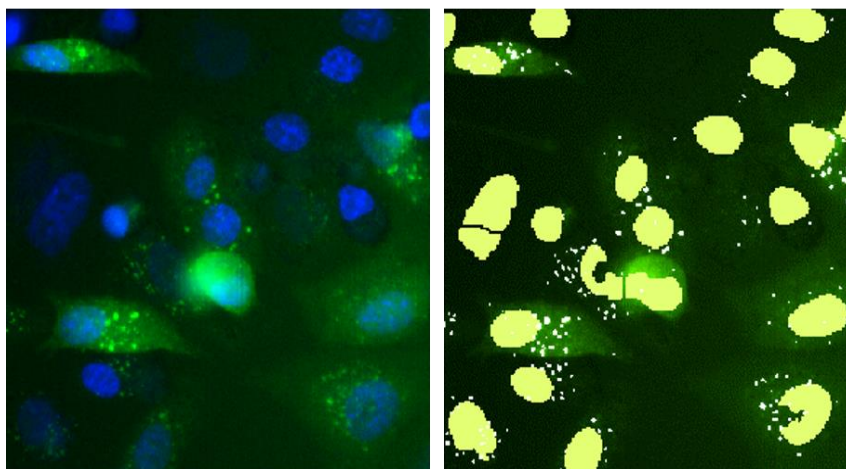
A**B****Imagem original****Imagem segmentada**

Figura 3 – Imagens representativas de receptores EGFR internalizados em células A549 ativadas com EGF. **A-** Imagens representativas de células A549 ativadas com EGF 50 ng/mL adquiridas durante 30 minutos pós-ativação. As setas (branco) indicam os receptores EGFR internalizados. Linha superior: células controles, sem exposição à frequência (Controle – 1h); Linha inferior: células expostas à frequência durante 1h (Exposição – 1h); EGRF (GFP - verde); Núcleo celular (Hoechst 33342 – azul). **B-** Imagem representativa de segmentação das imagens a partir dos parâmetros estabelecidos de tamanho e intensidade de fluorescência. Imagem a esquerda: imagem adquirida pelo equipamento. Imagem a direita: segmentação do núcleo (amarelo) e segmentação dos receptores EGFR internalizados (pontos brancos). Imagens obtidas pelo equipamento ImageXpress XLS Micro (Molecular Devices), segmentadas e quantificadas pelo *software* MetaXpress (versão 5.3.0.5, Molecular Devices).

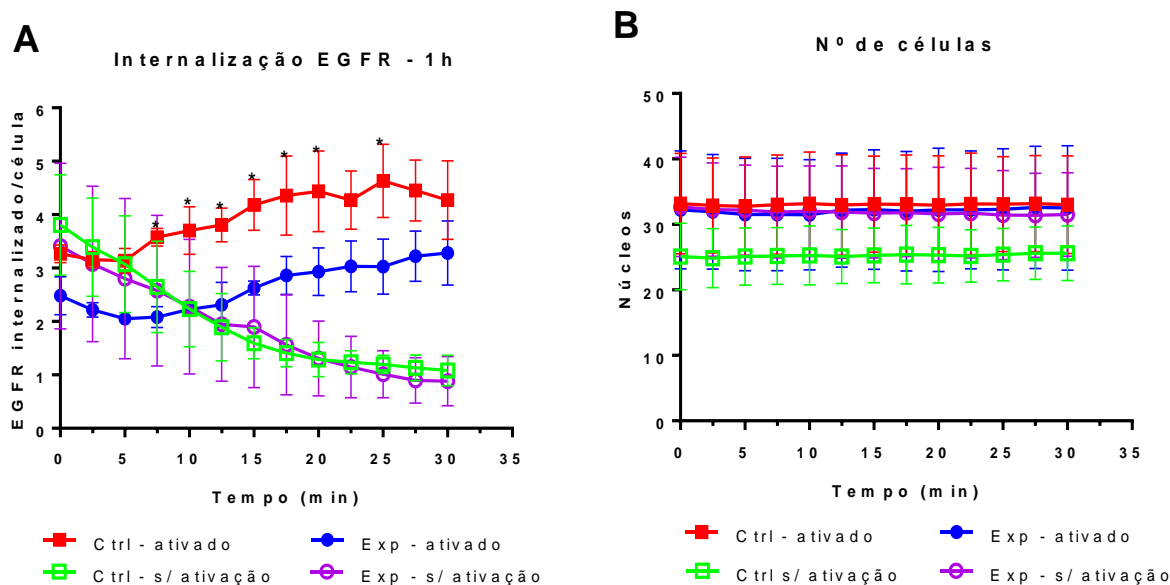


Figura 4 – Internalização de receptores EGFR. O número de receptores EGFR internalizados em células A549 ativadas (ativado) ou não (s/ ativação, ○ e □) com EGF 50 ng/mL foi avaliado durante 30 minutos após a ativação. (A) Quantificação do número de receptores EGFR internalizados em células sem exposição (Ctrl, ■) e expostas à frequência (Exp, ●) por 1 hora. (B): Número de células obtido a partir da quantificação de núcleos celulares. O número de amostras em todas as condições não apresentou variação, dado que a contagem do número de células não apresentou diferença significativa em todos os tempos. Análises estatísticas realizadas pelo *software* Prism 7 (GraphPad Prism, versão 7.04, 2017) com teste estatístico *Two-way* ANOVA e fator de correção de Sidak. Valores comparados ao controle sem exposição. *=p<0,05.

Para melhor avaliar a redução do número de receptores EGFR em relação às amostras controles, os valores foram analisados em porcentagem. Para isso, os dados foram normalizados considerando como 100% os valores das amostras controles. Os resultados obtidos demonstraram que as células expostas à frequência reduziram, em média, 31% o número de receptores internalizados em relação às células controles (Figura 5 e Tabela 1).

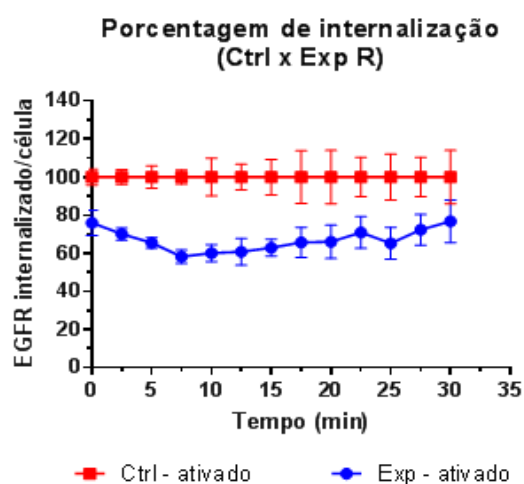


Figura 5 – Porcentagem de receptores internalizados após 1 hora de exposição à frequência. Valores normalizados, nos quais o número de receptores presentes nas amostras expostas à frequência (Exp, ●) está representado em relação aos valores controles (Ctrl, ■).

Tabela 1 – Porcentagem de redução do número de receptores EGFR após exposição à frequência.

Porcentagem de redução (Controle:Exposto)		
Tempo (min)	Redução	DP (%)
0:00	-24%	± 6,66
2:30	-30%	± 3,14
5:00	-34%	± 2,82
7:30	-42%	± 3,51
10:00	-40%	± 4,47
12:30	-39%	± 7,04
15:00	-37%	± 4,53
17:30	-34%	± 8,01
20:00	-34%	± 8,75
22:30	-29%	± 8,27
25:00	-35%	± 8,50
27:30	-28%	± 8,11
30:00	-23%	± 11,18

7. Considerações finais

A partir dos dados obtidos até o momento foi possível concluir que a exposição de células de carcinoma pulmonar humano (A549) à frequência desenvolvida para interferir no domínio extracelular do receptor EGFR, durante 1 hora, apresentou redução significativa da internalização de receptores EGFR, sem alterações detectáveis no número de células