



Relatório Científico

Efeitos da exposição a frequências sobre a função
da proteína SNAIL em células de adenocarcinoma
de mama MCF-7

Dr. Paulo Peitl Júnior

1. Introdução

O Câncer corresponde ao conjunto de doenças multifatoriais que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. O desenvolvimento de células normais para o estado neoplásico envolve o acúmulo progressivo de mutações no genoma celular que interferem na expressão de genes necessários para a manutenção da homeostase celular. Algumas das características que são adquiridas pelas células cancerosas contribuem, de fato, para a promoção do tumoral. Entre elas encontram-se: insensibilidade a fatores antiproliferativos, instabilidade genômica e mutação, resistência a morte, potencial replicativo ilimitado, invasão tecidual e metástase.

Em diversos tipos de cânceres, como no de mama, pode ocorrer o desprendimento de células do tumor primário e subsequente processo de metástase, o qual corresponde a dissipação e invasão dessas células para tecidos adjacentes ou mesmo sítios distantes. Eventos celulares complexos e sucessivos responsáveis pela característica metastática de tumores primários são chamadas de cascata de invasão metastática. Durante esse processo, as células perdem sua capacidade de adesão célula-célula, ganham motilidade e, em alguns casos, são capazes de penetrar no endotélio e proliferar em sítios distantes. Essa redução da adesão celular é conhecida como transição epitélio-mesenquimal (EMT), caracterizada pela reorganização e expressão de proteínas de citoesqueleto e pela produção de enzimas de degradação de matriz extracelular, que favorecem a aquisição de propriedades locomotoras invasivas. Apesar de serem muito importantes durante o desenvolvimento embrionário, quando essas mudanças de fenótipo epitelial para fenótipo mesenquimal ocorrem durante a cascata metastática, elas favorecem o desprendimento de células do tumor primários e a extravasão das mesmas para vasos linfáticos e sanguíneos.

O processo de EMT é caracterizado por alterações na expressão e distribuição de fatores epiteliais (E-Caderina; B-Catenina) e mesenquimais (Vimentina e N-Caderina), além da participação de repressores transcricionais específicos de E-Caderina, como as proteínas SNAIL (fator de transcrição da família SNAI, do inglês *Zinc finger protein SNAI*). E-Caderina e SNAIL apresentam funções chaves e muito empenho científico tem sido empregue na elucidação dos mecanismos regulatórios desse processo. A ativação patológica da proteína Snail1, leva à aquisição de propriedades invasivas de tumores epiteliais, como descrito após a primeira indicação do envolvimento de genes de Snail no desencadeamento de EMT. Estudos anteriores demonstraram a superexpressão de SNAIL em vários tipos tumorais e sua correlação com a agressividade, metástase, recorrência e falta de prognóstico. Análises de biópsias obtidas de tumores de mama; tumores gástricos; carcinomas

hepatocelulares; cânceres do cólon e sarcomas sinoviais confirmaram que a expressão do SNAIL se correlaciona com a diminuição da expressão da caderina-E, com desdiferenciação e invasividade. Como a perda de expressão de E-Caderina em tumores é considerada um marcador de mau prognóstico clínico, os repressores da E-Caderina são considerados marcadores de malignidade, e como alvos para drogas anti-invasivas.

Em suma, os avanços nos últimos anos levaram ao nosso entendimento de que os genes Snail são novos alvos potenciais de drogas anti-invasivas devido à sua associação com tumores metastáticos desdiferenciados de diferentes origens. Deste modo, é muito importante identificar repressores endógenos para entender como as células embrionárias param de migrar quando atingem seus tecidos-alvo e também inibidores sintéticos para interferir especificamente na delaminação de células de tumores primários. É possível que a inativação de SNAIL possa ajudar a prevenir a invasão e ajudar a tornar as células invasivas mais suscetíveis à destruição.

Neste sentido, futuros avanços em nossa compreensão dos mecanismos de ação e regulação da família de genes do SNAIL nos ajudarão a obter melhor entendimento sobre as vias essenciais do desenvolvimento e em uma das características mais desafiadoras do câncer, o início do processo metastático.

2. OBJETIVO

Avaliar a migração de células de adenocarcinoma de mama expostas a frequências direcionadas a proteína SNAIL.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Seleção da sequência para interferência com frequência

Para o desenvolvimento da frequência foi selecionada região responsável pela diferenciação epitélio-mesenquimal. Para isso, a sequência do domínio *Zinc finger* da proteína SNAIL foi obtida a partir dos dados depositados no *Protein Data Bank* (disponível em: <https://www.rcsb.org/>) (Figura 1).

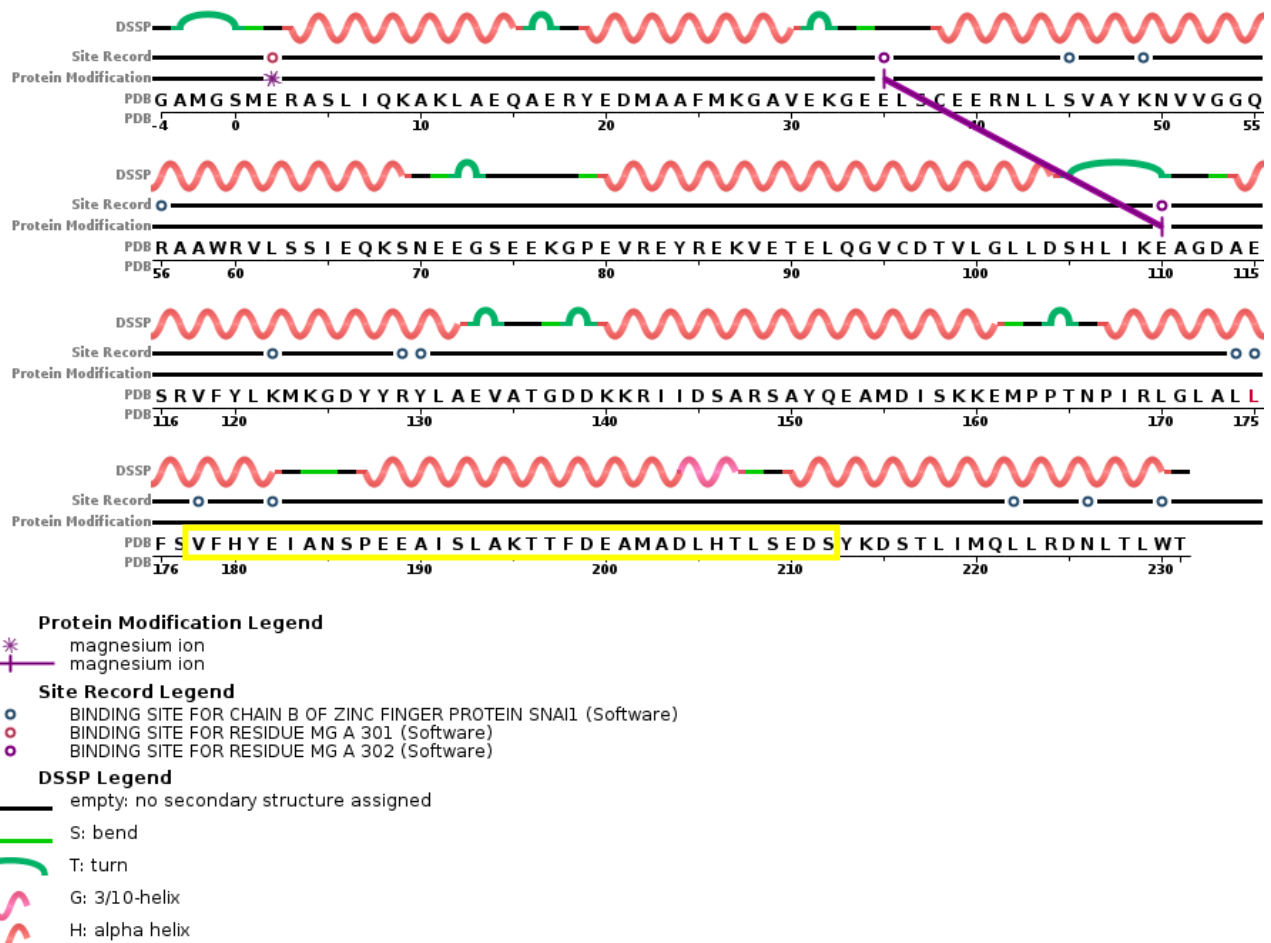


Figura 1 - Sequência do domínio *zinc finger* da proteína SNAIL. A caixa em amarelo destaca a região selecionada para interferência. Informações disponíveis no *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=4QLI>).

3.2. Cultivo celular

A linhagem epitelial MCF-7 (células de adenocarcinoma da glândula mamária) foram cultivadas em garrafas de 75 cm² contendo DMEM com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico estreptomicina/penicilina à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.3. Ensaio de migração celular

A migração celular foi avaliada pelo ensaio de *Wound-healing*. Para isso, células MCF-7 foram crescidas em placas de cultura de 6 poços (2x10⁵ células/poço) até atingirem 80% de confluência. Com o auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL foi produzido um risco nas placas e as mesmas foram lavadas três vezes com PBS para a remoção das células. Em seguida, adicionou-se meio de cultura completo às células e fixou-se o “device” emissor das frequências a uma das placas (exposta), sendo a outra mantida como controle. As placas foram incubadas em estufas separadas a 37°C e após 13, 26,

42, 72 e 120 horas foram adquiridas fotos de todas as amostras com auxílio do equipamento de *High Content Screening* ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices) (Figura 2).

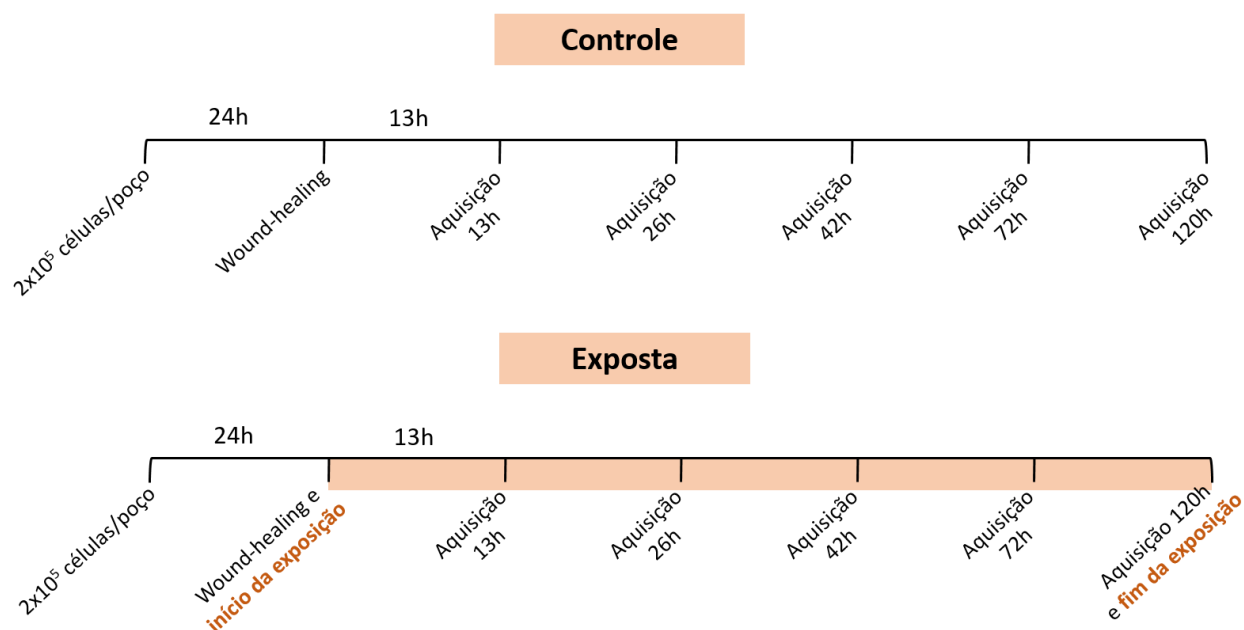


Figura 2 - Desenho experimental para exposição às frequências e aquisição de imagens. Representação da ordem de eventos realizados para tratamentos e aquisição de imagens das placas controle (Controle) e com exposição à frequência (Exposta). A faixa laranja representa o período de exposição das células as frequências.

3.4. Quantificação da migração

A quantificação da migração foi avaliada através da área migratória disponível e quantificação do número de células presentes na área riscada (*wound-healing*). Os dados foram obtidos com o auxílio do programa ImageJ 1.52i (<http://imagej.nih.gov/ij>).

3.5. Análise estatística

Os dados das triplicatas experimentais foram plotados e analisados estatisticamente no programa GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software). O teste Two-way ANOVA foi realizado para comparação entre os grupos controle e exposto e os tempos de aquisição de imagem. Os resultados com valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Delimitação da área de migração disponível

Após a aquisição de imagens das placas controle e exposta foi selecionada aleatoriamente uma imagem de cada triplicata para realizar as quantificações, totalizando três imagens de cada condição. A delimitação da área de migração disponível foi realizada através do programa ImageJ, no qual as margens do risco foram determinadas manualmente através de uma ferramenta disponível no mesmo. Esse procedimento foi realizado com as imagens selecionadas em todos os tempos (Figura 3A). Os valores de área obtidos no programa foram representados por meio da porcentagem de área disponível para migração (Figura 3B) e valores absolutos de área (Figura 3C). Após 72 horas, verificamos a redução média de 82% na área de migração das amostras controle em relação ao tempo inicial (13h = 100%). Diferentemente, as amostras expostas às frequências reduziram para 56% a área de migração após 72h. Esses dados demonstraram que as células MCF-7 expostas às frequências apresentaram menor taxa de migração em relação às células controle.

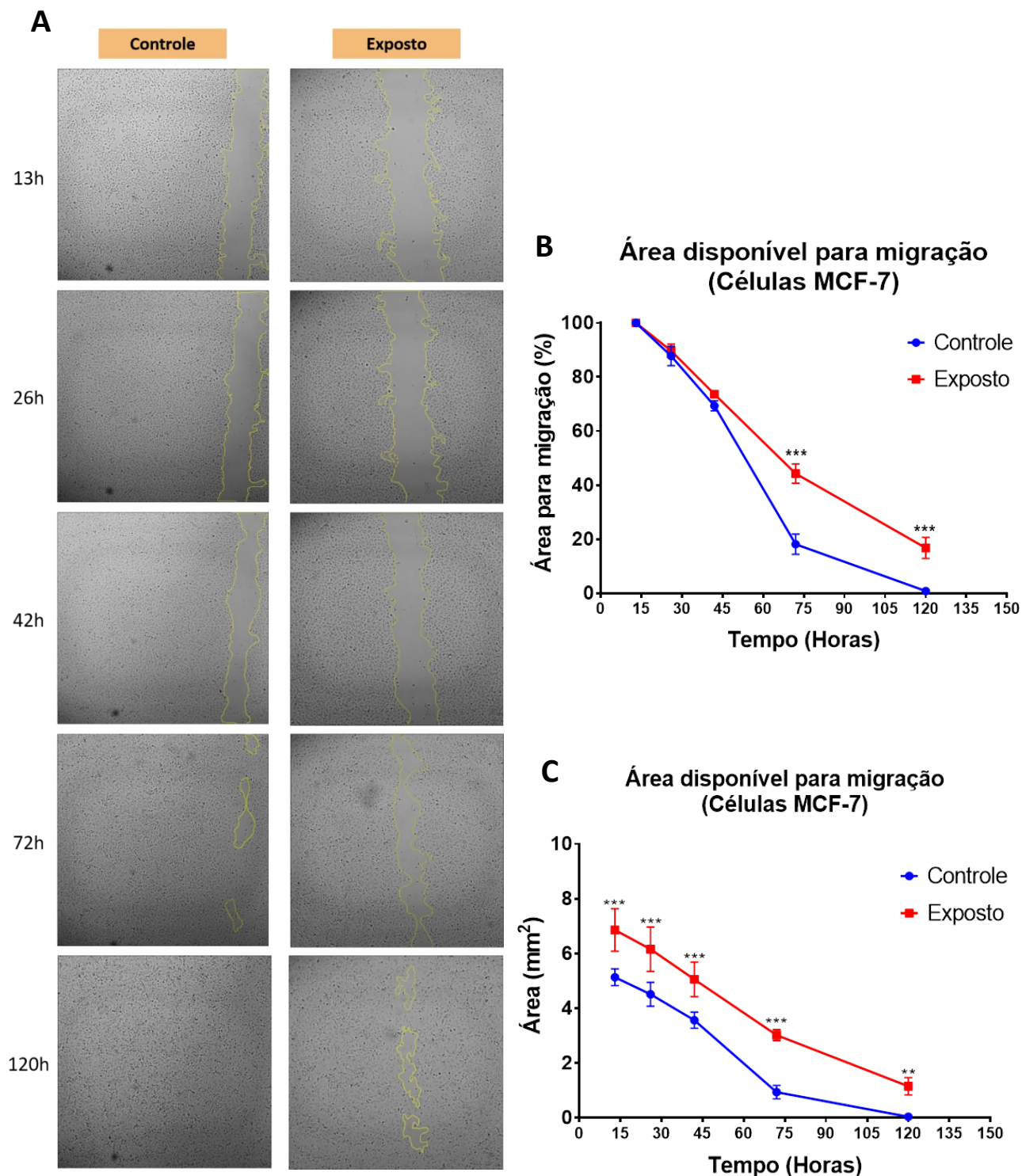


Figura 3 – Determinação da área disponível para migração. Ensaio de *wound-healing* realizado com células MCF-7. (A) Imagens representativas da área disponível para migração demarcada manualmente (linhas em amarelo) com o auxílio do programa ImageJ 1.52i. (B) Quantificação da porcentagem de área disponível para migração. Os valores correspondentes ao tempo inicial de avaliação foram utilizados como referência (13h = 100%) para as comparações seguintes. Análises estatísticas realizadas pelo *software* Prism 7 (GraphPad Prism, versão 7.04, 2017) com teste estatístico *Two-way* ANOVA e fator de correção de Dunnet. ***= $p < 0,001$. (C) Quantificação dos valores absolutos da área disponível para migração. 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. **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,005$.

4.2. Quantificação da proliferação celular na área de migração

Após avaliar a área de migração, o número de células presentes nessa área foi quantificado ao longo tempo. A área determinada no tempo de 13h foi utilizada como referência para quantificar os tempos posteriores. Tanto a seleção da área de interesse como a segmentação das imagens foram realizadas no programa ImageJ (Figura 4A). Em seguida, os valores obtidos do número absoluto de células presentes na área de migração e a relação do número de células/área foram plotados e analisados com o auxílio do GraphPad Prism. As amostras controle apresentaram, em média, 107 e 120 células/mm² após 72h e 120 horas, respectivamente (Figura 4B). Interessantemente, as células expostas às frequências apresentaram redução estatisticamente significativa comparadas ao controle, correspondentes a 62 e 71 células/mm² após 72 e 120 horas, respectivamente. De forma similar, os valores absolutos do número de células presentes na área de migração apresentaram diferença estatística significativa entre controle e exposição a partir de 72h de avaliação (Figura 4C), demonstrando, portanto, que a exposição de células MCF-7 as sequências de frequências geradas pelo algoritmo EFFATHA que possuíam como “ALVO” uma sequência de aminoácidos da proteína SNAIL reduziram a migração e proliferação celular.

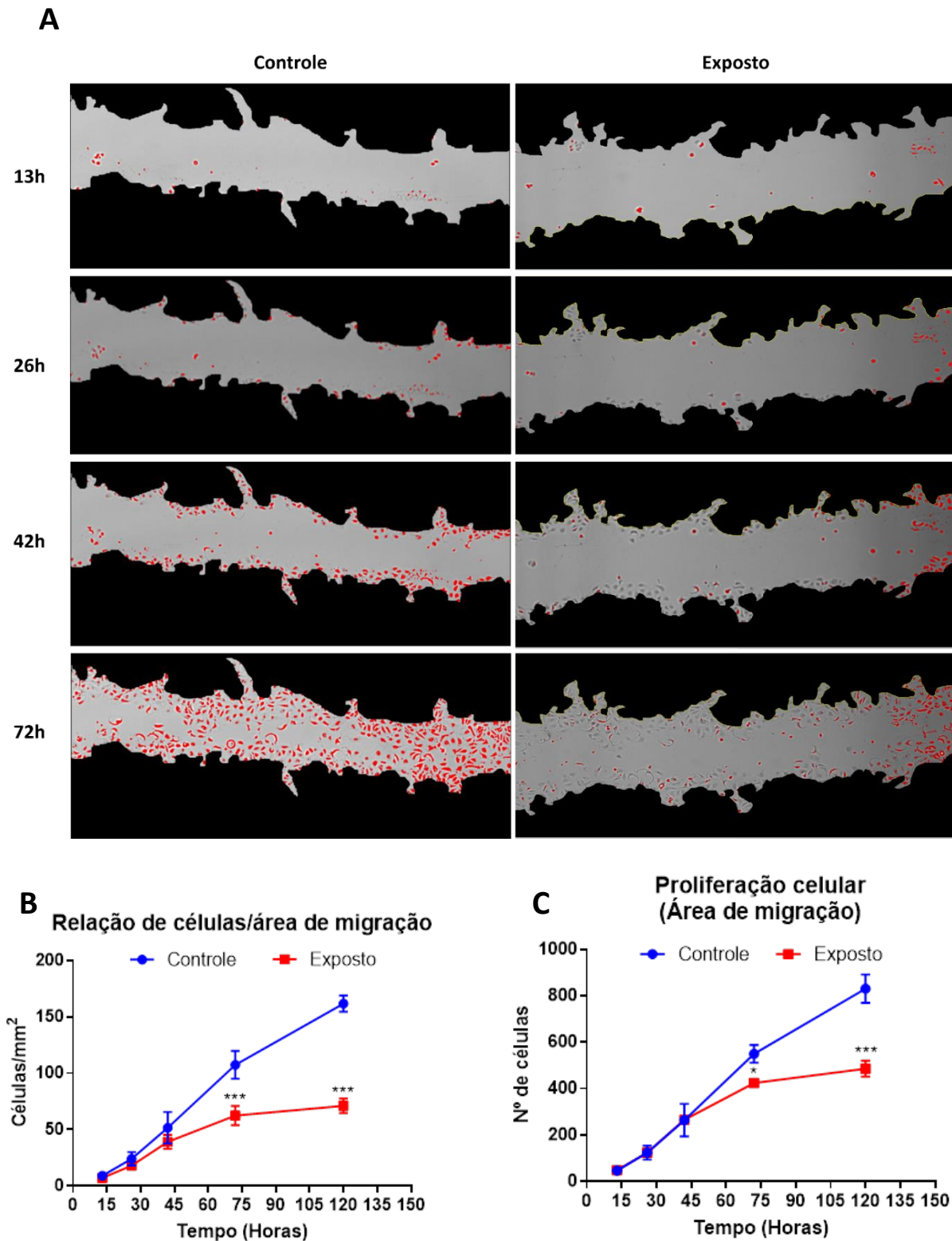


Figura 4 – Proliferação celular e migração na área de wound-healing. (A) Imagens representativas da segmentação realizada no programa ImageJ 1.52i. (B) Quantificação do número de células em relação a área disponível para migração e (C) quantificação do número de células presentes na área de migração. A área calculada no tempo de 13 horas foi utilizada como referência para os cálculos de proliferação celular. 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. *= $p < 0,05$; ***= $p < 0,001$.

5. Conclusão

Os dados apresentados neste relatório demonstram que as sequências de frequências geradas pelo algoritmo EFFATHA que possuíam como “ALVO” uma sequência de aminoácidos da proteína SNAIL apresentaram efeito significativo sobre a migração celular de células MCF-7 após 72 horas de exposição. A técnica de *wound-healing* permitiu avaliar a diferença de 26% na redução da área de migração e também na proporção de 45 células/mm² entre as condições analisadas após 72 horas. Portanto, os dados apresentados no presente relatório demonstram a relevância da utilização da TECNOLOGIA EFFATHA para o controle da migração de células tumorais em modelo de adenocarcinoma de glândula mamária.