



INIBIDOR DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE BAIXA MASSA MOLECULAR DIMINUI A AGRESSIVIDADE DAS CÉLULAS DE CÂNCER DE ESTÔMAGO

Palavras-Chave: câncer de estômago, proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular, hallmarks do câncer

Autoras:

Letícia Maria de Oliveira Magalhães, IB, UNICAMP

Beatriz Aires Lopes, IB, UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Carmen Veríssima Ferreira Halder, IB, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O câncer gástrico é uma doença de importância global, sendo o quinto câncer mais diagnosticado no mundo (Smyth et al. 2020; Machlowska et al. 2020). Sua mortalidade, no entanto, é extremamente alta, resultando em mais de 700.000 mortes no mundo em 2018 (Smyth et al. 2020). A alta mortalidade se deve ao fato do diagnóstico ser tardio e, portanto, muitas vezes já em metástase.

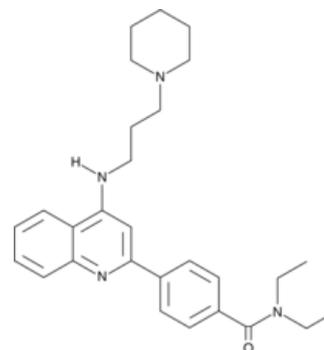
No contexto molecular há muitos aspectos que necessitam ser elucidados. Neste sentido, elementos como as fosfatases, que possuem um papel essencial nas modificações pós-traducionais e influenciam no metabolismo celular tumoral, têm surgido como candidatos a biomarcadores e como alvos terapêuticos. A família das proteínas tirosina fosfatases (PTPs) é constituída por mais de 100 membros, os quais catalisam a hidrólise do grupamento fosfato no resíduo de tirosina, resultando como produtos uma proteína desfosforilada no resíduo de tirosina e um fosfato inorgânico (Ferreira-Halder et al. 2020).

A proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMWPTP ou ACP1) é uma das representantes da família PTP. Apresenta peso molecular de 18 kDa, e é amplamente expressa em diferentes tecidos. Sua superexpressão é correlacionada à pior prognóstico e baixa chance de sobrevivência, além de uma maior agressividade tumoral (Faria et al. 2021). Considera-se que alguns processos intracelulares de tumores têm sido associados à LMWPTP: quimiorresistência, modulação do metabolismo energético, defesa antioxidante, migração e comunicação célula-célula (Faria et al. 2021). Apesar de ser uma proteína que interfere em diversas vias tumorais (em particular a de quimiorresistência), pouco se sabe sobre o impacto da LMWPTP no contexto tumoral gástrico. A validação do uso da enzima LMWPTP no monitoramento da resposta à quimioterapia e como alvo para o desenvolvimento de fármacos, pode ser essencial para uma maior efetividade terapêutica e melhor qualidade de vida a pacientes oncológicos.

Recentemente, o grupo do Prof. Nunzio Bottini sintetizou uma gama de inibidores da LMWPTP, com biodisponibilidade oral, dentre os quais o inibidor (N, N-dietil-4-(4 -((3-(piperidin-1-il) propil) amino) quinolin-2-il) benzamida) apresentou alta potência. Tal inibidor foi capaz de se ligar ao intermediário fosfo-cisteína da LMWPTP e ocupar totalmente o sítio ativo, evitando o acesso da molécula de água necessária para a hidrólise na etapa final da catálise.

Portanto, o enfoque deste trabalho é a avaliação da influência do inibidor I da LMWPTP na sobrevivência e na migração da

linhagem de câncer gástrico, Kato III, em comparação às células gástricas normais, GES-1.



**Figura 1: Estrutura química do inibidor I da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular:
N,N-dietil-4-[4-[[3-(1-piperidinil)propil]amino]-2-quinolinil]-benzamida.**

METODOLOGIA:

Avaliação da viabilidade celular através do ensaio de redução do MTT: Células de câncer de estômago humano foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 ou 6×10^5 células/mL em placas de 24 poços (volume de plaqueamento por poço: 1000 μ l), e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24h. Após a retirada do meio de plaqueamento o inibidor ou somente o meio foi adicionado nos poços. Em seguida as placas foram incubadas por 24h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e atmosfera úmida. Como controle foi utilizado meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após realização dos protocolos experimentais de tratamento, o meio foi removido, e em seguida adicionado meio DMEM sem soro contendo o sal MTT (0,8 mg/mL). Após incubação por 4h a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e foram adicionados 1000 μ L de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida no leitor de placas (ELx 800 BIO-TEK) em $\lambda = 570$ nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle (Mosmann, 1983).

Ensaio de migração das células de câncer de estômago: para migração celular foi utilizado o método de "scratch" que consiste da criação de uma interrupção ou "ferida" na monocamada de células e acompanhar o fechamento da mesma. As células Kato III foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas em atmosfera umidificada, 5% CO₂ a 37°C. Após constatação da confluência da monocamada, foi feito o "scratch" em linha reta com o auxílio de uma ponteira p200. Os debris formados foram removidos, os poços foram lavados com PBS e em seguida o meio de tratamento foi adicionado. Os poços foram observados em microscópio invertido e as imagens foram capturadas nos tempos 0, 24 e 72 horas. Com as imagens capturadas, foi feita a contagem de células

que migraram para a região do “scratch” em cada um dos tempos experimentais. O cálculo da porcentagem do fechamento da ferida foi feita pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ fechamento da ferida} = (\text{área livre na } 0\text{h} - \text{área livre na } x\text{h}) / \text{área livre na } 0\text{h}.$$

Análise de morte celular utilizando marcação com Anexina V-FITC/7-AAD: Células câncer de estômago ($1,3 \times 10^6$ células) foram plaqueadas em garrafas T25 e cultivadas por 24 h, a 37°C , 5% CO_2 . Foram utilizadas 4 condições principais (Meio de cultura padrão das linhagens, sendo "RPMI" para a Kato III e "DMEM" para a GES-1. Um controle positivo de morte celular, utilizando-se DMSO 5%. E, por último, duas condições de tratamento, sendo $1\mu\text{M}$ representando o IC_{50} do inibidor e uma dose acima deste, de $5\mu\text{M}$). Após realização dos protocolos experimentais de tratamento com o inibidor da LMWPTP as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Após lavagem com PBS gelado, 1×10^6 células foram ressuscitadas em $100\ \mu\text{L}$ de *Binding buffer* 1X [0,1 mol/L HEPES (pH 7,4); 1,4 mol/L NaCl; 25 mmol/L CaCl_2] e transferidas para tubos FACS. As amostras foram incubadas com $5\ \mu\text{L}$ de anexina V conjugada com FITC e $5\ \mu\text{g/mL}$ de 7-AAD por 15 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. A seguir, foram adicionados $200\ \mu\text{L}$ de *Binding buffer* 1X e as amostras foram analisadas (30.000 eventos por amostra) em citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton Dickinson) usando-se o programa CellQuest 2.8. A análise da porcentagem das diferentes populações marcadas foi realizada utilizando-se o programa ModFit 3 (Verity Software House).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Inibidor da LMWPTP afeta a viabilidade celular de células tumorais gástricas

O ensaio de viabilidade por redução do MTT é fundamental para a compreensão de quanto cada concentração afeta as diferentes linhagens estudadas no projeto. Ressalta-se a diferença entre a queda de viabilidade das células cancerígenas (Kato III) quando comparadas à linhagem epitelial gástrica (GES-1). A partir dos resultados do ensaio, podemos inferir um importante dado sobre o inibidor: o IC_{50} para cada linhagem celular. Para a Kato III (Figura 2a), temos que o IC_{50} é de $2,8\ \mu\text{M}$. Em complemento a isso, na maior dose utilizada de inibidor, $5\ \mu\text{M}$, a GES-1 (Figura 2b) ainda possui 80% de viabilidade celular (comparado com 38% para a Kato III, na mesma concentração). Isso demonstra o poder do inibidor em células de câncer gástrico, mas com pouca ação em células epiteliais normais, sendo assim um resultado muito promissor para futuras aplicações.

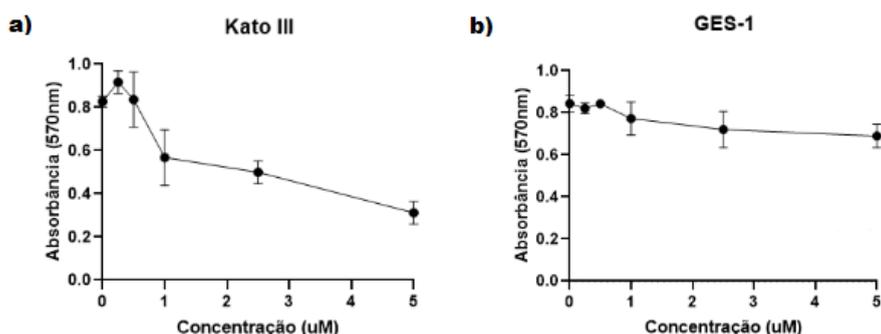


Figura 2. Queda da viabilidade celular da Kato III medida pelo ensaio de redução do MTT (a) enquanto a mesma se mantém estável na linhagem GES-1 (b). Os pontos representam as absorbâncias em relação às diferentes concentrações de 0 μM ; 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 2,5 μM e 5 μM .

A migração de células tumorais gástricas é impedida pelo inibidor

Para a Kato III (Figura 3a), a condição controle teve 42% da ferida preenchida com 24h, atingindo 100% com 72h. Com 0,5 μM , a porcentagem de fechamento após 24h foi de 10%, enquanto que com 1 μM foi de 13%. A diferença não foi tão alta em 72h, sendo de 13% e 15%, respectivamente, mostrando uma inibição significativa da migração (85%). Em ambas condições com o inibidor, as células demonstram maior deposição de matriz de maneira desordenada, ao tentar migrar sem sucesso. Os mesmos tratamentos foram realizados na GES-1 (Figura 3b), uma linhagem de célula epitelial gástrica normal. Com 24h de tratamento, as células demonstraram grande capacidade de migração, já fechando completamente o scratch realizado. Além disso, não houve alterações morfológicas, o que reafirma os resultados de que o inibidor não causa efeito nas células GES-1. Demonstra-se, portanto, que o inibidor não afeta as células normais estomacais, enquanto que inibe em 85% a migração em células de câncer gástrico.

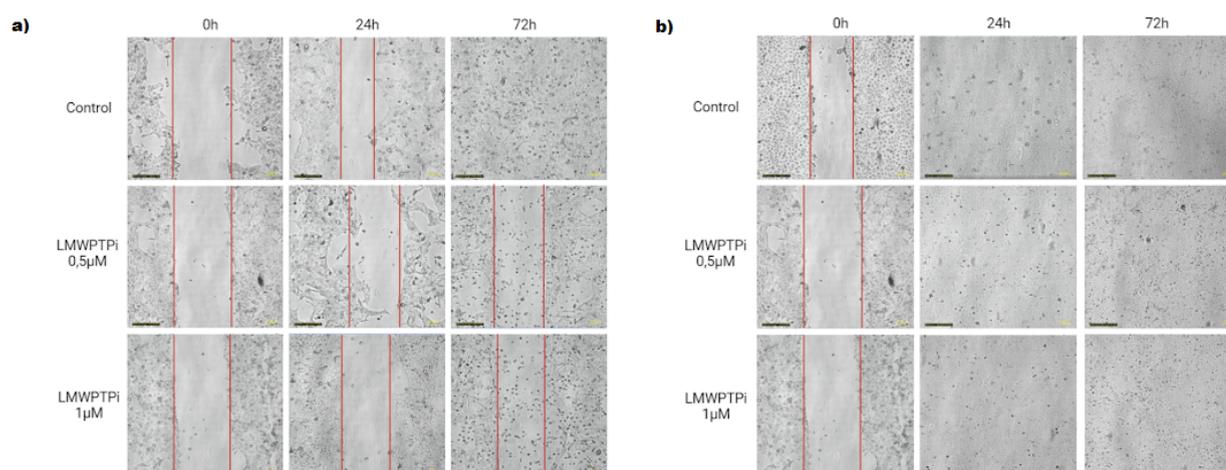


Figura 3. Migração da Kato III é afetada pelo inibidor da LMWPTP (a) contraposto com o fechamento total da ferida na GES-1 (b). As células foram tratadas com 0,5 μM e 1 μM de LMWPTPi por até 72 horas, sendo as feridas analisadas no tempo de 0h, 24h e 72h.

O inibidor de LMWPTP não causa morte das células normais.

Em relação à GES-1, todos os tratamentos ficaram com cerca de 90% das células viáveis, número igual ao das células controle, mantidas somente com o meio DMEM (Figura 4b). Não houve diferença significativa entre as concentrações de inibidor. Logo, o inibidor não ocasionou morte em células normais estomacais, reafirmando outros resultados obtidos com a linhagem.

Para a Kato III (Figura 4a), na condição de tratamento com 1 μM de inibidor, as células viáveis representam 69,6%. Já com 5 μM , estas configuram 58,2% do total, uma diminuição muito sutil. Em todos os tratamentos, a apoptose tardia foi a mais observada, atingindo seu pico com 39,5% com o tratamento de 5 μM . A morte celular provavelmente não é a principal ação do inibidor, que demonstradamente afeta mais outros hallmarks do câncer como migração e adesão celular.

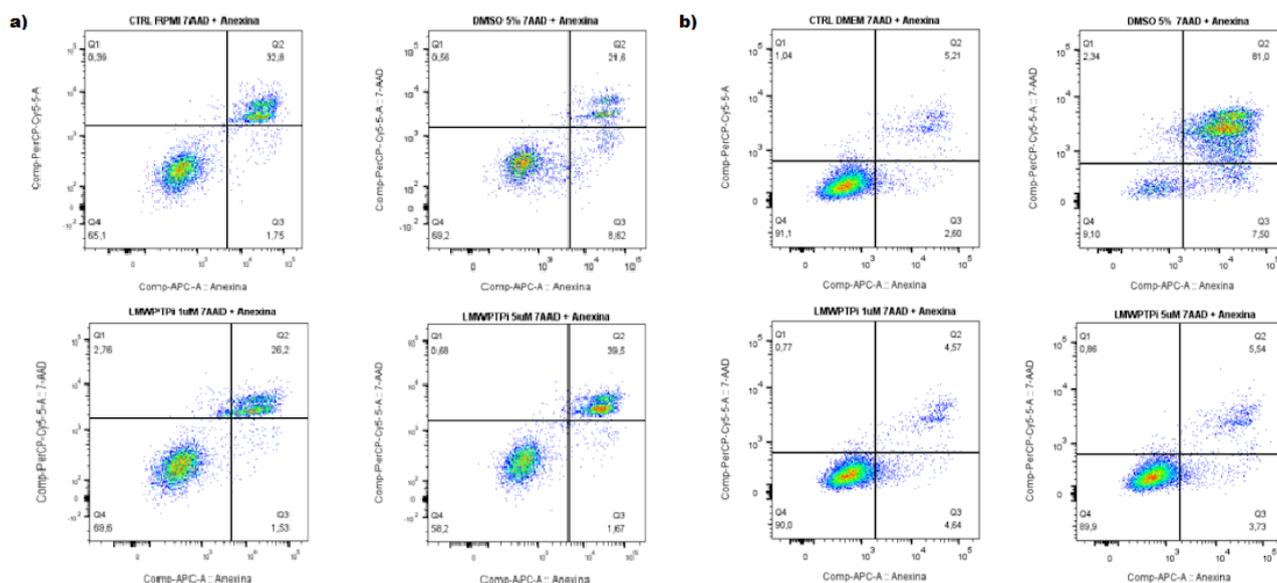


Figura 4. Ensaio de morte celular da Kato III (a) e GES-1 (b) por Anexina/7-AAD. As células foram tratadas com o inibidor da LMWPTP (1 e 5 μ M) por 24h. DMSO 5% foi utilizado como controle positivo de morte. Os quadrantes correspondem, respectivamente, a células necróticas (Q1); células em apoptose tardia (Q2); células em apoptose inicial (Q3) e células viáveis (Q4).

CONCLUSÕES:

Os dados obtidos indicam que o inibidor da fosfatase LMWPTP causou uma redução na migração em dosagem subtóxica, além de se observar indução da apoptose, na linhagem Kato III. Em contrapartida, houve pouca influência na viabilidade das células gástricas normais (GES-1), conforme observado nos ensaios de migração, viabilidade e morte celular.

Esses resultados destacam a relevância da ação antitumoral do inibidor, bem como o comprometimento da integridade morfológica das células tumorais, culminando na drástica diminuição da sobrevivência. É importante ressaltar que essas ações foram observadas em concentrações relativamente baixas, em células tumorais gástricas, enquanto as células epiteliais normais do estômago não sofreram alterações significativas, o que é uma característica essencial para sua possível aplicação clínica, visando sua potencial utilização como terapia antitumoral contra tumores gástricos.

BIBLIOGRAFIA

- Faria, A. V. S., Fonseca, E. M. B., Cordeiro, H. G., Clerici, S. P. & Ferreira-Halder, C. V. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase as signaling hub of cancer hallmarks. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 1263–1273 (2021).
- Ferreira-Halder, C. et al. Protein Tyrosine Phosphatases in Tumor Progression and Metastasis: Promoter or Protection? in *Tumor Progression and Metastasis* (eds. Lasfar, A. & Cohen-Solal, K.) (2020).
- Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R. & Sitarz, R. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *IJMS* 21, 4012 (2020).
- Mosmann, T. (1983) *J Immunol Methods.* 65(1-2): 55-63
- Smyth, E. C., Nilsson, M., Grabsch, H. I., van Grieken, N. C. & Lordick, F. Gastric cancer. *The Lancet* 396, 635–648 (2020).
- Wu, C.-W., Kao, H.-L., Li, A. F.-Y., Chi, C.-W. & Lin, W. Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues. *Cancer Letters* 242, 95–103 (2006).