

Caracterização de metaloproteinases (MMPs) em exossomos de células tumorais de mama

PACHANE, Bianca C.^{1*}; ALTEI, Wanessa F.¹; SELISTRE DE ARAUJO, Heloisa S.¹

¹ Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos

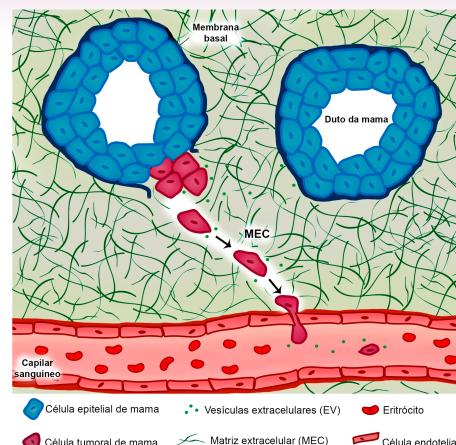
e-mail: biancapachane@gmail.com

INTRODUÇÃO

A invasão celular é uma das principais etapas da metástase, no qual células tumorais migram ativamente pelo tecido adjacente mediante ação de moléculas de adesão, componentes do citoesqueleto e enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (Figura 1).

As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) têm papel importante, visto que a clivagem do colágeno tipo I mediada pelas enzimas libera o sítio de ligação da integrina $\alpha V\beta 3$, desencadeando cascadas de sinalização citoplasmática para invasão celular.

Recentemente, verificou-se que a invasão celular também é auxiliada por vesículas extracelulares, especialmente pelos exossomos. Exossomos são significativamente mais abundantes em células tumorais, podendo reprogramar células saudáveis para adquirirem capacidade metastática.



OBJETIVO

Identificação e avaliação da atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9 em exossomos isolados e purificados de células tumorais de mama (MDA-MB-231) e o estudo do papel da integrina $\alpha V\beta 3$ durante a invasão celular, por meio do bloqueio desse receptor com a desintegrina recombinante DisBa-01.

MATERIAIS E MÉTODOS

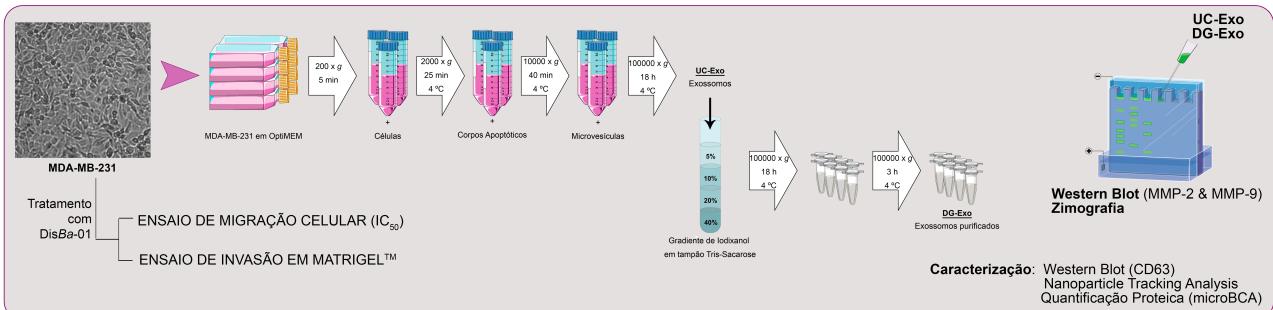
Expressão e Purificação de DisBa-01

(RAMOS *et al.*, 2008)

Expressão heteróloga em *Escherichia coli* BL21(DE3)

Purificação em Cromatografia de Afinidade à íons Níquel e em Cromatografia de Troca Aniónica

Quantificação proteica (BCA)



RESULTADOS

Expressão e purificação de DisBa-01

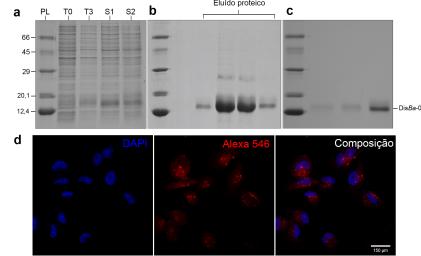


Figura 2. Biossíntese e funcionalidade de DisBa-01. Géis SDS-PAGE referentes ao processo de a. Biossíntese de DisBa-01; b. Purificação por cromatografia de afinidade à íons níquel; c. Purificação por cromatografia de troca aniónica; d. Ensaio de fluorescência com DisBa-01 marcada com AlexaFluor 546 (vermelho) indicam sua interação com células tumorais de mama (núcleo em azul). Aumento: 63 x.

Detectão de Gelatinases Vesiculares

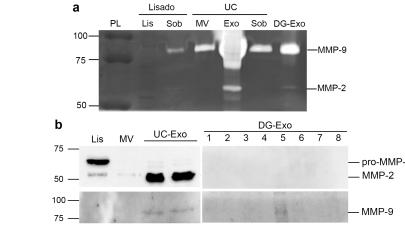


Figura 6. Detecção de MMP-2 e MMP-9 em exossomos isolados e purificados de células tumorais de mama a. Zimograma indicando atividade proteolítica de MMP-9 e MMP-2. Ambas as gelatinases são encontradas na sobrenadante do lisado, em UC-Exo e DG-Exo b. Presença de pro-MMP-2 (72 kDa), MMP-2 (66 kDa) e MMP-9 (84 kDa) em lisado celular, UC-MV e UC-Exo de MDA-MB-231, detectadas por western blot

Ensaio de Invasão em Matrigel™

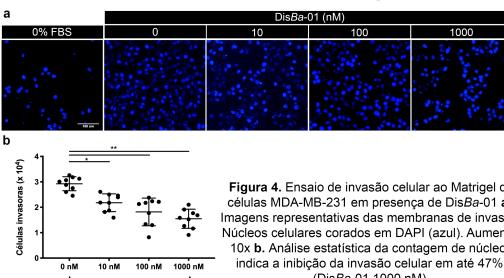


Figura 4. Ensaio de invasão celular ao Matrigel de células MDA-MB-231 em presença de DisBa-01 a. Imagens representativas das membranas de invasão. Núcleos celulares corados em DAPI (azul). Aumento: 10x b. Análise estatística da contagem de núcleos indica a inibição da invasão celular em até 47% (DisBa-01 1000 nM).

Ensaio de Migração Celular

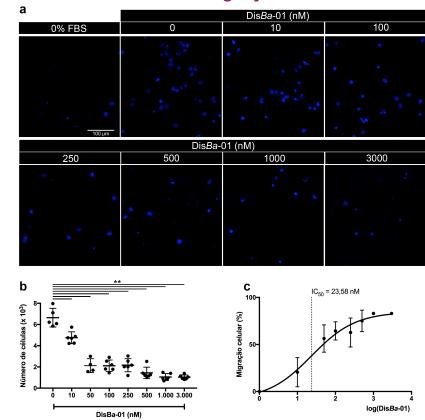


Figura 3. Ensaio de migração celular *transwell* de células MDA-MB-231 sob influência de DisBa-01 a. Imagens demonstrativas das membranas contendo núcleos corados em DAPI (azul). Aumento: 10x. b. Bloqueio da integrina $\alpha V\beta 3$ por DisBa-01 inibe a migração de MDA-MB-231 c. Determinação do IC_{50} de DisBa-01 na migração celular mediante interpolação dos valores obtidos experimentalmente a uma curva sigmoidal.

Caracterização de Vesículas

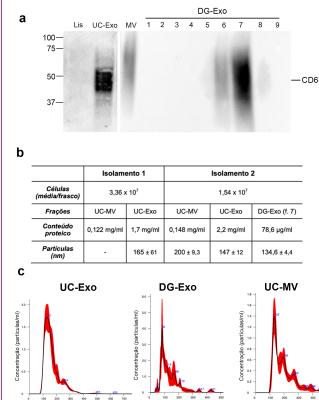


Figura 5. Caracterização das vesículas extracelulares isoladas e purificadas de MDA-MB-231 a. Detecção da tetraspanina CD63 por Western Blot confirma a identidade das vesículas b. Descrição do conteúdo proteico e tamanho de partículas obtido em dois isolamentos de vesículas de MDA-MB-231 c. Análise de partículas das amostras isoladas e purificadas por ultracentrifugação

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a presença das enzimas MMP-2 e MMP-9 em exossomos, podemos inferir que essas vesículas participam da degradação ativa da MEC, auxiliando no processo de invasão de células tumorais no tecido adjacente