



# Universidade: presente!



## XXXI SIC



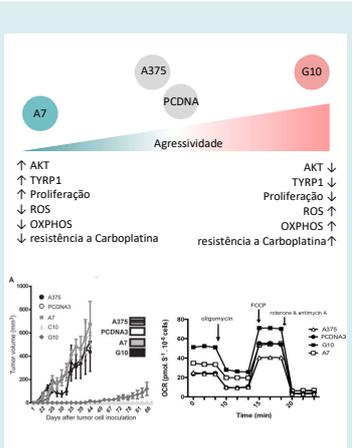
21. 25. OUTUBRO. CAMPUS DO VALE

### Dinâmica mitocondrial em modelo *in vitro* de agressividade de melanoma humano

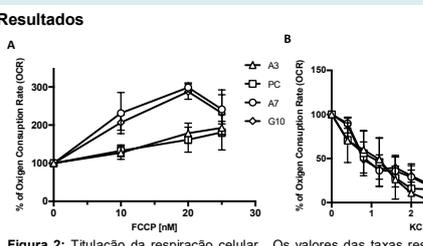
Aluna: Camila Kehl Dias; Orientador: Fábio Klamt.

**Introdução**  
 O melanoma, câncer de pele originário dos melanócitos, se forma a partir do acúmulo de inúmeras mutações em genes específicos, que são selecionadas pelo microambiente tumoral de forma a desenvolver-se em um tumor maligno.  
 O melanoma, câncer de pele originário dos melanócitos, se forma a partir do acúmulo de inúmeras mutações em genes específicos, que são selecionadas pelo microambiente tumoral de forma a desenvolver-se em um tumor maligno. Previamente, a linhagem A375 de melanoma maligno humano foi transfectada com cDNA de catalase no vetor pCDNA3 dando origem às linhagens A7 e G10, e à linhagem PCDNA3 (transfectada com o vetor vazio) com distintos padrões de agressividade. A caracterização dessas linhagens revelou que a mais agressiva, G10, apresenta maior nível de desdiferenciação, capacidade de migração, doubling-time e resistência ao tratamento com carboplatina, além de um fenótipo oxidativo. Sabendo-se que a morfologia e dinâmica mitocondriais são fatores que estão intrinsecamente relacionadas com o metabolismo, esse modelo foi utilizado para estudar a dinâmica mitocondrial de acordo com fenótipo de diferentes agressividades de melanoma.

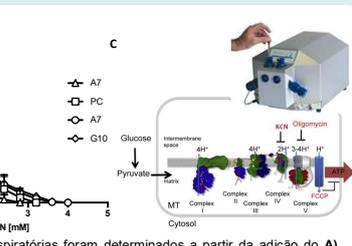
**Materiais e Métodos**  
 As linhagens A375, PCDNA3, A7 e G10 foram mantidas em meio DMEM/F12 suplementado com ácido ascórbico, ácido pirúvico, galactose e insulina em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os valores das taxas respiratórias que inibe ou aumenta em 50% a respiração mitocondrial foram determinados pela modulação com KCN e FCCP, respectivamente, utilizando Oximetria de Alta Resolução. A modulação da dinâmica mitocondrial em resposta aos inibidores respiratórios foi determinada por métodos morfométricos (*Mitogenie software* e microscopia confocal) e por citometria de fluxo de células incubadas com *Mitotracker Red* e *Mitotracker Green*. Western blot foi realizado com amostras tratadas ou não com FCCP e KCN para avaliar possível translocação da enzima piruvato cinase para a mitocôndria.



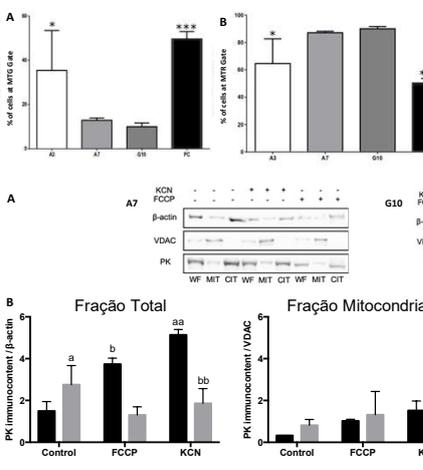
**Figura 1:** Prévia caracterização A) Representação esquemática do padrão de agressividade da linhagem celular A375, PCDNA3, A7 e G10 B) Curvas de crescimento tumoral ao longo do tempo após a inoculação em camundongos *Nude* C) Perfil respiratório das linhagens de melanoma humano.



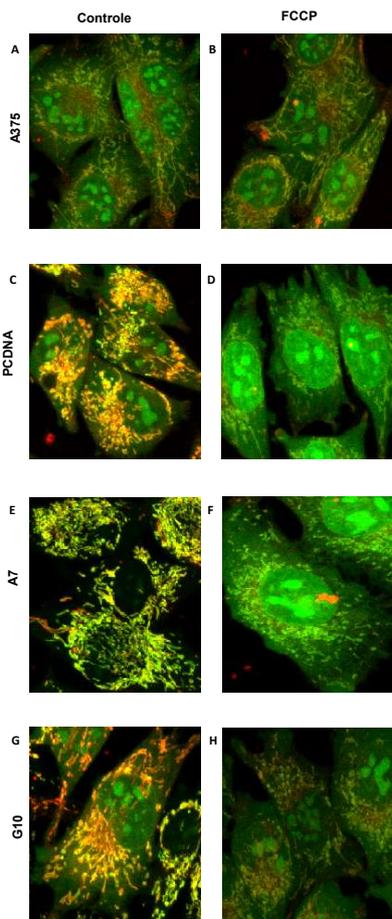
**Figura 2:** Titulação da respiração celular. Os valores das taxas respiratórias foram determinados a partir da adição do A) ativador da respiração FCCP (10nM – 30nM) ou B) adição do inibidor da respiração KCN (0.6 mM – 4mM). C) Esquema ilustrativo do local de ação dos moduladores da respiração. KCN inibe o complexo IV, impedindo o consumo de oxigênio. FCCP desacopla a fosforilação oxidativa da produção de ATP. Fonte: Zhiyin Xun et al. (2012). As concentrações de KCN e FCCP que inibem e aumentam em 50% a respiração foram aplicadas em todos os experimentos.



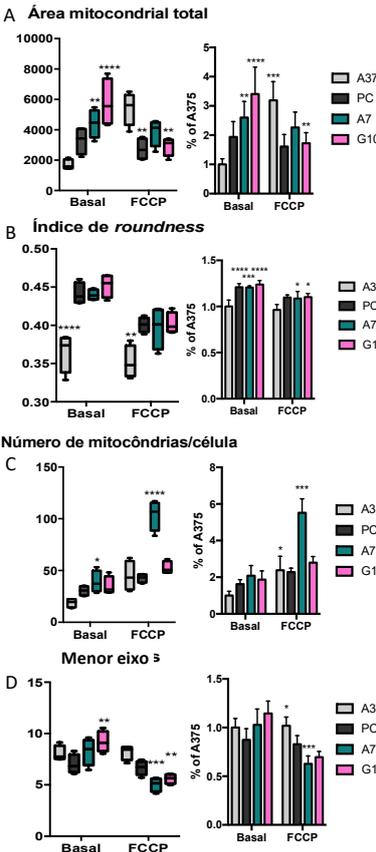
**Figura 3:** Perfil mitocondrial das linhagens A375, PCDNA3, A7 e G10. A) % de apresentando maior marcação com *Mitotracker Green*, marcador massa mitocondrial B) % de células apresentando maior marcação com *Mitotracker Red*, marcador do potencial de membrana mitocondrial. O experimento foi realizado no citômetro *FACS Calibur*. Os dados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.



**Figura 4:** Modulação da respiração mitocondrial altera o imunocônto de Piruvato Cinase. A) Imagens representativas dos ensaios de Western Blot B) A partir da quantificação das bandas das proteínas piruvato cinase (PK),  $\beta$ -actina e VDAC (marcador mitocondrial) foi possível realizar a comparação estatística das razões do imunocônto de piruvato cinase (PK) e  $\beta$ -actina ou piruvato cinase e VDAC nas frações total, mitocondrial (MIT), citosólica (CIT) e fração total (WF). A quantificação das bandas foi feita pelo *software Image Lab*. As diferenças significativas entre A7xG10 está representado pela letra "a" e as diferenças entre controle e tratado estão representados pela letra "b". Dados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.



**Figura 5:** Imagens representativas da comarcação das sondas *Mitotracker Green* e *Red* em microscopia confocal A) A375 basal; B) A375 tratada com FCCP (respiração desacoplada); C) PCDNA3 basal; D) PCDNA3 tratada com FCCP; E) A7 basal; F) A7 tratada com FCCP; G) G10 basal; H) G10 tratada com FCCP.



**Figura 6:** Análise morfométrica de fragmentação mitocondrial indica diferenças de nível de fragmentação/rede entre as linhagens de melanoma humano. A) Número de mitocôndrias por célula B) Índice de roundness C) Número médio de mitocôndrias por célula D) Medida da média do menor eixo das mitocôndrias de cada linhagem. Os dados foram obtidos por quantificação de pixels a partir das imagens obtidas em microscopia confocal com as sondas *Mitotracker* pelo *software Mitogenie*. Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguido de teste de Sidak.

**Discussão**  
 As sondas de *Mitotracker Green* e *Red* indicam que as linhagens A375 e PCDNA3 apresentam maior proporção de mitocôndrias com menor atividade. Já as linhagens A7 e G10 apresentaram maior proporção de mitocôndrias com potencial de membrana ativo, condizendo com o perfil mais oxidativo de G10, porém não com o perfil mais glicolítico de A7 (dados prévios). A análise morfométrica de fragmentação mitocondrial das imagens de microscopia confocal indicam que o tratamento com FCCP causa fragmentação das mitocôndrias de forma diferencial entre as linhagens. Além disso, a linhagem G10 apresenta maior área mitocondrial basal e maior média do menor eixo das mitocôndrias, apresentando mitocôndrias maiores e mais fragmentadas, condizendo com seu perfil oxidativo. Foi visto que o tratamento da linhagem G10 com FCCP e com KCN diminui a quantidade total de piruvato cinase, porém a sua presença na mitocôndria não se altera com o tratamento, condizendo com resistência da linhagem G10 observada em experimentos prévios. Já a linhagem caracterizada por ser menos agressiva e mais glicolítica (A7) apresentou aumento do conteúdo de piruvato cinase e também sua translocação para a mitocôndria, mediante tratamento com KCN.

**Conclusão**  
 Diferentes padrões de agressividade reagem de formas distintas a modulação da respiração mitocondrial, podendo-se alterar tanto a morfologia da mitocôndria quanto a localização e imunocônto de enzimas da glicólise, como a piruvato cinase. Considerando o metabolismo mais oxidativo de G10, é visível que sua dinâmica mitocondrial é diferenciada, tendo fragmentação mitocondrial basal distinta e mais facilmente modulável com FCCP que em relação às outras linhagens. Considerando a resistência intrínseca apresentada por G10, a mitocôndria pode ser um alvo de tratamento específico, neste caso.  
**Perspectivas:** Aplicar a análise do *software Mitogenie* nas imagens em microscópio confocal com a sonda *Mitotracker* nas linhagens tratadas com KCN. Avaliar o imunocônto de proteínas de fissão e fusão mitocondrial, assim como possíveis alterações de suas expressões mediante tratamento com FCCP e KCN.

Aprovação ética e apoio financeiro: MCT/CNPq INCT-TM (#573671/2008-7), MCTI/CNPQ/CBAA (465113/2014-1).

