

Análise da Difusão Celular em Linhagens com Potencial Metastático

Monique Siebra Krug¹, Rita Maria Cunha de Almeida¹

¹Instituto de Física, UFRGS

INTRODUÇÃO

Câncer é a segunda maior causa de morte atualmente, e a maior parte dos pacientes que vem a óbito apresentou metástase de um ou mais tumores primários. Para que ocorra metástase, as células cancerosas devem passar pela Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*), a qual confere mobilidade às células, de modo que possam migrar para novos sítios, invadir outros tecidos e estabelecer focos de tumor secundários (Spano *et al.*, 2012).

A mobilidade celular é um processo natural com alta importância na embriogênese, cicatrização e tráfego de leucócitos (Huber *et al.*, 2013). Neste trabalho, o foco será no deslocamento celular conhecido como rastejamento, o qual é um processo caracterizado como mecânico, mas mediado por proteínas específicas – entre elas, Rho GTPases, actina, miosina e tubulina. A Figura 1 exemplifica esse processo simplificado:

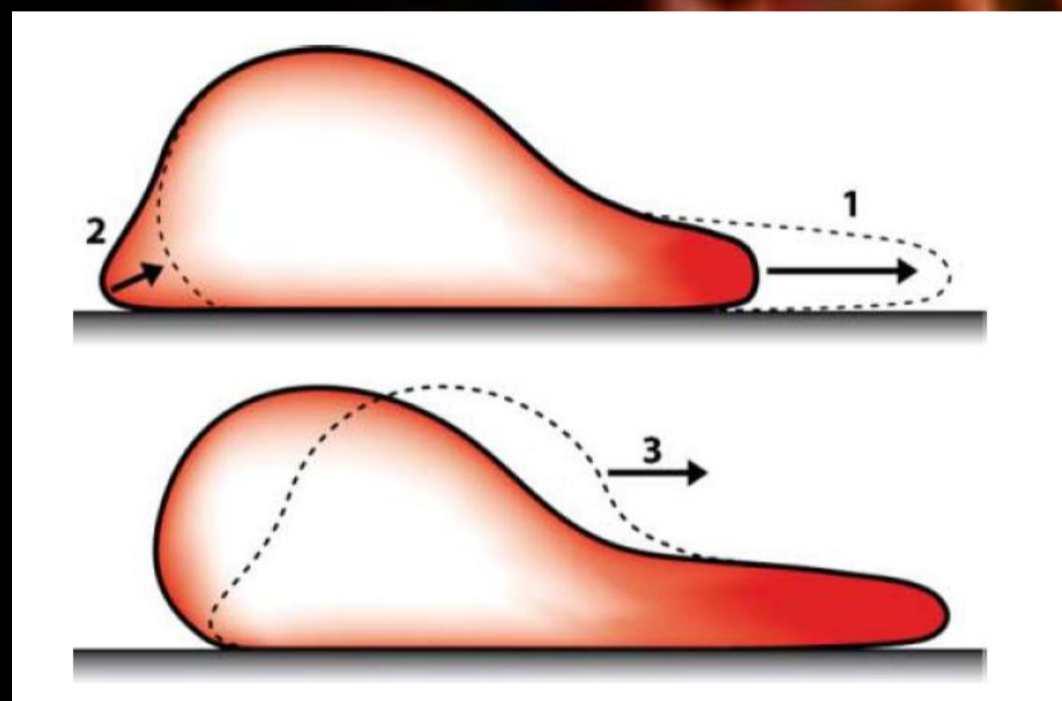


Figura 1. Rastejamento de uma célula. Primeiro há a protrusão de uma parte da membrana, seguida de adesão (1). Depois, há a contração da parte oposta da membrana (2). Por fim, há o deslocamento do centro de massa da célula (3). Retirado de Huber *et al.*, 2013.

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho é propor uma nova medida *in vitro* para migração e invasão celular e correlação entre o potencial metastático de uma linhagem celular e sua difusividade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Células da linhagem MCF7 foram cultivadas como descrito previamente na literatura: em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de antibiótico (Ampicilina e Estreptomicina) a 37°C e 5% de CO₂.

Para os experimentos, as células foram tripsinizadas em fase estacionária, com confluência de 90-95% da garrafa e contadas em Câmara de Neubauer, e 5 x 10⁴ células/mL foram colocadas em placas de 24 poços. Durante a aquisição de imagens, HEPES (Invitrogen) a 20 mM foi adicionado ao meio de cultura utilizado, segundo protocolo do fabricante. A temperatura foi mantida durante todo o experimento. Durante as três primeiras horas, as células foram deixadas para se aderirem, sem que fotos fossem tiradas.

As imagens foram adquiridas por microscópio óptico invertido, com a objetiva de 10x, através do programa QCapture Pro, o qual registrava as imagens em intervalos de um minuto durante 20 horas.

Dez células que migraram durante o experimento foram acompanhadas, calculando-se o deslocamento de cada uma através da posição no tempo x menos a posição do tempo inicial.

A partir do deslocamento individual, calculou-se o deslocamento médio de cada célula em um intervalo de tempo. Feito isso, calculou-se a equação da reta do logaritmo do deslocamento médio, segundo o qual caracteriza-se um sistema difusivo.

REFERÊNCIAS

- HUBER, F.; SCHNAUS, J.; RÖNICKE, S.; RAUCH, P.; MÜLLER, K. Advances in Physics Emergent complexity of the cytoskeleton : from single filaments to tissue. n. May 2013, p. 37-41, 2013.
SPANO, D.; HECK, C.; ANTONELLIS, P. DE; CHRISTOFORI, G.; ZOLLO, M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Seminars in cancer biology*, v. 22, n. 3, p. 234-49, jun 2012.

RESULTADOS

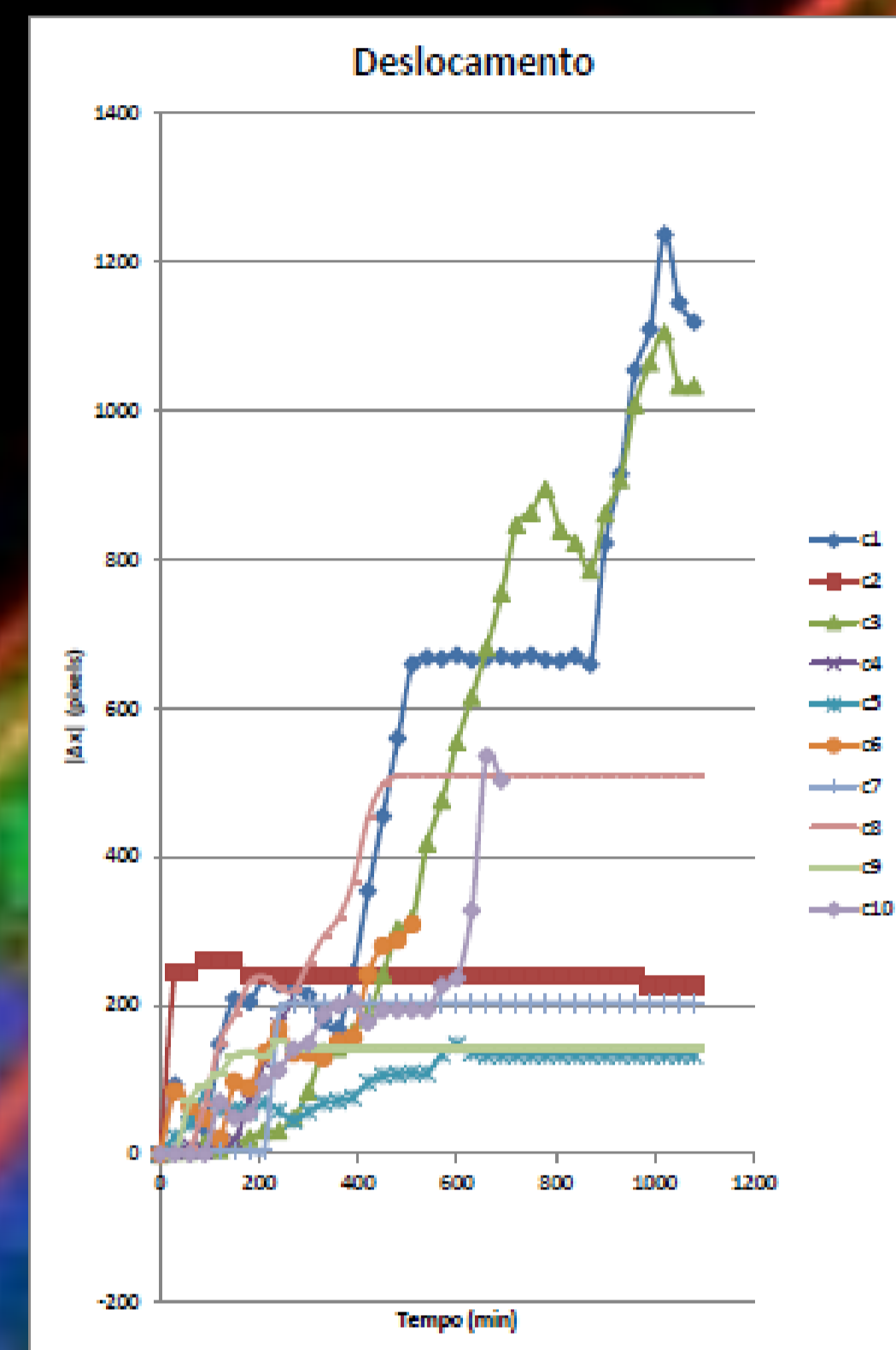


Figura 2. Deslocamento das células em relação à posição inicial durante o experimento. Nessa figura, é possível ver o monitoramento do deslocamento a partir do ponto inicial (em módulo) em pixels de dez células diferentes ao passar do tempo. Inclinações positivas indicam distanciamento do ponto inicial, enquanto inclinações negativas indicam aproximação.

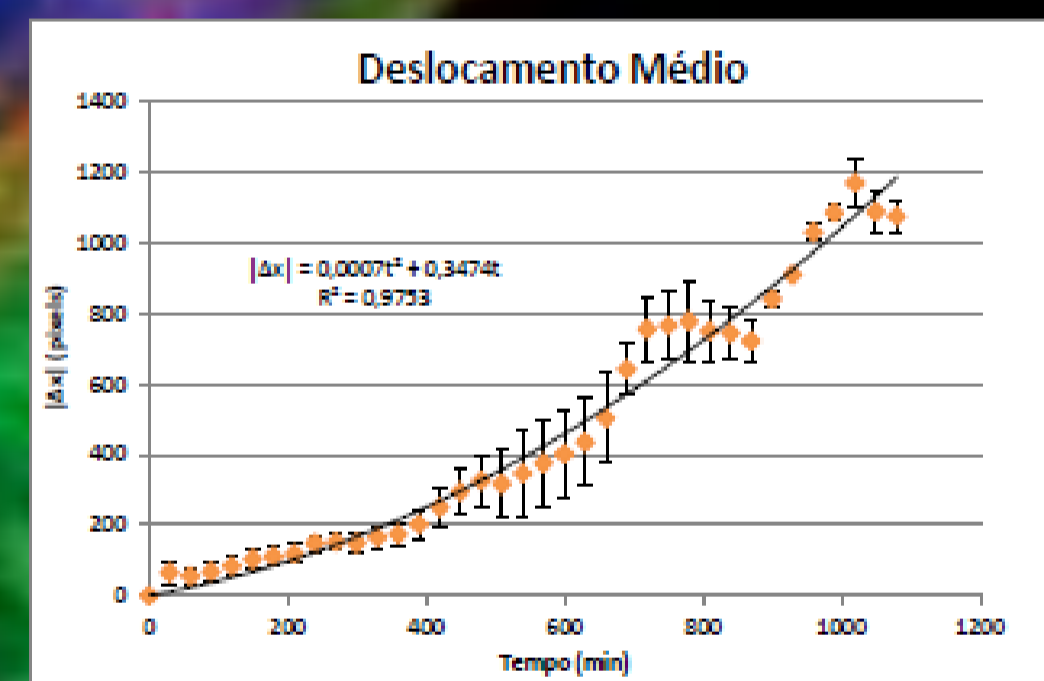


Figura 3. Deslocamento médio das células. As barras indicam o Erro Padrão da média de . A linha preta indica a tendência da difusividade, com a equação mostrada. R² é o Coeficiente de Determinação.

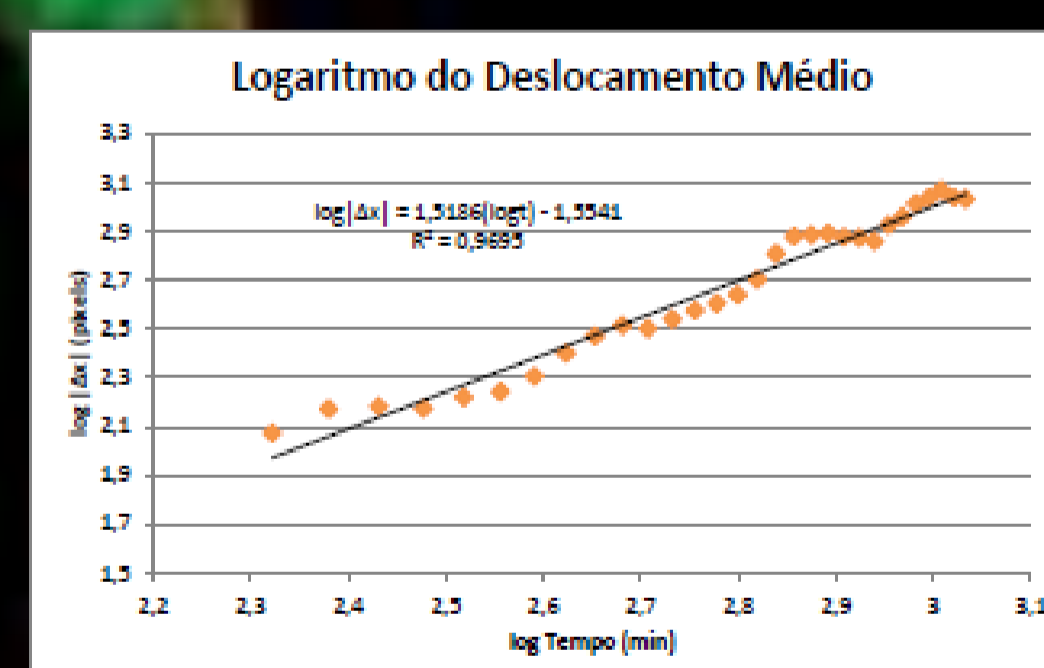


Figura 4. Logaritmo do deslocamento médio das células. A linha preta indica a tendência do logaritmo do deslocamento, com a equação mostrada. R² é o Coeficiente de Determinação.

DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

As células da linhagem utilizada não apresentaram comportamento difusivo, mostrando um padrão de movimento retilíneo variado. Isso provavelmente é decorrente da complexidade bioquímica que rege o processo de rastejamento, o que explicaria o fato de as células terem direções preferenciais de movimento, o que reflete a organização do citoesqueleto.

Como perspectivas futuras, testar essa metodologia em outras linhagens de diferentes tipos celulares, tempos de experimento diferentes e diferentes substratos de adesão irá ajudar a validar o método. Além disso, experimentos envolvendo fluorescência de proteínas do citoesqueleto também são válidos.