

Contribuição dos receptores purinérgicos P2X7 e P2Y2 na aquisição fenotípica GABAérgica e na progressão metastática cerebral do câncer de mama triplo negativo

Ana Carolina Galdino Picolli

Orientadora: Claudiana Lameu

Instituto de Química – Universidade de São Paulo

ana.gpicolli@usp.br

Objetivos

1. Padronizar um protocolo de indução de tumoresferas para obtenção de células-tronco tumorais (CSCs) não diferenciadas.
2. Avaliar, por RT-qPCR, a expressão de marcadores de pluripotência (ALDH1A1 e CD44) e mesenquimais (vimentin e N-cadherin), para definição do melhor protocolo de geração de células não diferenciadas
3. Induzir a diferenciação GABAérgica nas linhagens MDA-MB-231 parental e BR (com tropismo cerebral), com e sem bloqueio dos receptores P2X7 e P2Y2.
4. Avaliar, por RT-qPCR, a expressão do marcador neural (Nestina) e dos marcadores GABAérgicos (DLX2 e GAD1/67) nas células parental e BR, tratadas com e sem bloqueio dos receptores P2X7 e P2Y2.

Métodos e Procedimentos

As linhagens MDA-MB-231 parental e BR foram descongeladas e cultivadas em

frascos T25, em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos, a 37 °C e 5% de CO₂.

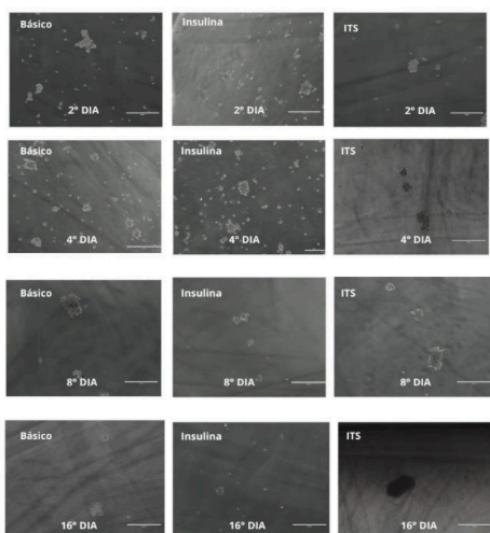
Para indução de tumoresferas, as células foram transferidas para frascos tratados com ácido plurônico (2%), visando a não aderência, e cultivadas em meio DMEM sem SFB, suplementado com bFGF-2, EGF e B27 (meio A), além de adicionados à insulina (meio B) ou ITS (meio C). As culturas foram incubadas por sete dias, com registro microscópico a cada três dias, e amostras foram coletadas para extração de RNA e análise de marcadores de por RT-qPCR.

O grupo que apresentou expressão mais elevada de marcadores de pluripotência (ALDH1A1, CD44) e mesenquimais (vimentina, N-caderina) foi reservado para o protocolo de diferenciação GABAérgica.

As tumoresferas selecionadas foram transferidas para placas revestidas com poli-D-lisina (50 µg/mL) e laminina (5 µg/mL) e cultivadas por 24h em DMEM com 5% SFB antes da substituição por meio neurobasal suplementado com B27 e BDNF (50 ng/mL), para diferenciação neural. O ácido retinoico (5 µM), também para diferenciação neural, foi adicionado por quatro dias, com ou sem

antagonistas dos receptores P2X7 e P2Y2. A morfologia foi monitorada em microscópio (dias 2, 4 e 6), e amostras foram armazenadas em TRIzol® para análise da expressão do marcador neural Nestina, e GABAérgicos DLX2 e GAD1/67 por RT-qPCR.

Resultados



As culturas mantidas em meio A (básico) e meio B (básico + insulina) apresentaram maior agregação celular e formação de tumoresferas maiores em comparação ao meio C (básico + ITS). Como os resultados de A e B foram semelhantes, ambos foram selecionados para continuidade do protocolo de diferenciação GABAérgica. O crescimento das tumoresferas foi mais pronunciado até o 5º dia de cultivo, após o qual houve redução progressiva em tamanho e quantidade.

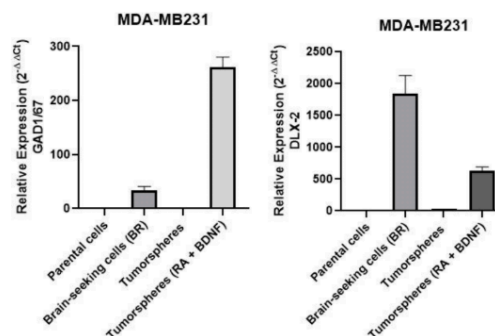


Figura 1. Expressão relativa de marcadores GABAérgicos **A)** GAD1/67 e **B)** DLX2 em células MDA-MB-231 parentais, BR, cultivadas em tumoresferas e cultivadas em tumoresferas tratadas com ácido retinóico (RA) + BDNF

Os marcadores GABAérgicos GAD1/67 e DLX2 apresentaram maior expressão nas células MDA-MB-231 BR, de tropismo cerebral, e nas tumoresferas submetidas ao protocolo de indução, sugerindo a transição para um fenótipo GABAérgico e aquisição de características que podem favorecer migração e colonização cerebral, contribuindo para o potencial metastático.

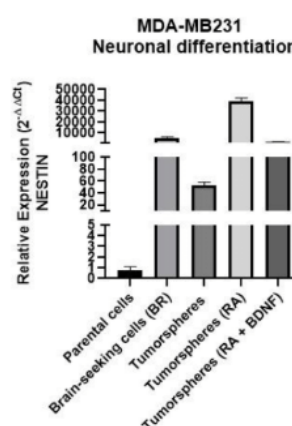


Figura 2. Expressão relativa do marcador neural Nestina células MDA-MB-231 parentais, BR, cultivadas em tumoresferas e cultivadas em

tumoresferas tratadas com ácido retinóico (RA) + BDNF

Em relação ao marcador de diferenciação neural Nestina, observou-se maior expressão nas células MDA-MB-231 BR e nas tumoresferas tratadas com ácido retinóico (AR) isoladamente ou em combinação com BDNF (Figura 2).

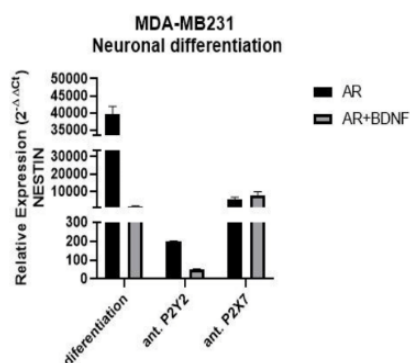


Figura 3. Expressão relativa do marcador neural Nestina células MDA-MB-231 parentais, BR, cultivadas em tumoresferas e cultivadas em tumoresferas tratadas com ácido retinóico (RA) + BDNF, com e sem a presença de antagonistas do receptor P2Y2 e P2X7

Já as tumoresferas submetidas à diferenciação na presença de antagonistas dos receptores purinérgicos apresentaram redução da expressão de Nestina (Figura 3) mais evidente com o bloqueio de P2Y2. Esse resultado sugere que o receptor P2Y2 exerce papel relevante na modulação da diferenciação neural, enquanto o impacto do antagonista de P2X7 foi menos pronunciado.

Conclusões

O estudo permitiu a padronização de um protocolo eficiente de indução de tumoresferas a partir das linhagens MDA-MB-231, estabelecendo condições adequadas. A análise

da expressão de marcadores por RT-qPCR demonstrou que o protocolo foi capaz de induzir a ativação de marcadores neurais e GABAérgicos, indicando a aquisição de um fenótipo GABAérgico associado ao potencial metastático cerebral. Além disso, a inibição do receptor P2Y2 reduziu significativamente a expressão de Nestina, sugerindo sua participação na regulação da diferenciação neural, enquanto o bloqueio do receptor P2X7 teve efeito menos expressivo. Esses achados reforçam o papel dos receptores purinérgicos na plasticidade fenotípica tumoral e apontam para potenciais alvos terapêuticos na metástase cerebral do câncer de mama.

A autora declara não haver conflito de interesses.

Referências

- U, J. H. et al. GABAergic neuronal differentiation induced by brain-derived neurotrophic factor in human mesenchymal stem cells. *Animal Cells and Systems*, v. 18, n. 1, p. 17–24.
- NEMAN, J.; CHOY, C.; KOWOLIK, C. M.; ANDERSON, A.; DUENAS, V. J.; WALIANY, S.; CHEN, B. T.; CHEN, M. Y.; JANDIAL, R. Co-evolution of breast-to-brain metastasis and neural progenitor cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, v. 30, n. 6.
- NEMAN, J.; TERMINI, J.; WILCZYNSKI, S.; VAIDEHI, N.; CHOY, C.; KOWOLIK, C. M.; LI, H.; HAMBRECHT, A. C.; ROBERTS, E.; JANDIAL, R. Human breast cancer metastases to the brain display GABAergic properties in the neural niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 3, 2014.
- VAN SWEARINGEN, A. E. D.; SIEGEL, M. B.; ANDERS, C. K. Breast cancer brain metastases: Evidence for neuronal-like adaptation in a “breast-to-brain” transition? *Breast Cancer Research*, v. 16, n. 3, 2014.