

POTENCIAL DE MEMBRANA COMO INFLUENCIADOR DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DO PEPTÍDEO MASTOPARAN-X

Annielle Mendes Brito da Silva^{1,2*}, Luisa Ribeiro-Silva¹, Manoel Arcisio-Miranda^{1*}

¹Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional - LaNEF, UNIFESP - SP, Brasil. ²Universidade Santo Amaro - UNISA - SP, Brasil.

*anniellemendes@gmail.com, arcisio.miranda@unifesp.br

INTRODUÇÃO

Os peptídeos anfifílicos catiônicos (PACs) vêm sendo propostos como promissores agentes terapêuticos anticâncer devido à sua capacidade de atacar e matar células cancerígenas por atividade membranolítica, impedindo o crescimento e a proliferação de tumores (FELÍCIO et al., 2017; GABERNET et al., 2016; SCHWEIZER, 2009). Esta atividade é atribuída principalmente à sua composição e estrutura, pois são peptídeos curtos (de 10 a 30 aminoácidos), em forma de hélice e carregados positivamente (SCHWEIZER, 2009; WALLBRECHER et al., 2017). Além disso, as características da membrana plasmática - como composição, hidrofobicidade, carga e potencial - podem contribuir para a atividade de PACs (SOUZA et al., 2015; YEAMAN; YOUNT, 2003).

A superfície negativa inerente às células cancerígenas deve-se a um maior conteúdo de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, contribuindo para um potencial de superfície negativo, o que aumenta a atração eletrostática entre os PACs e a célula-alvo e, conseqüentemente, a potência da atividade citotóxica destes peptídeos (BIRGE et al., 2016; DOS SANTOS CABRERA et al., 2012; FELÍCIO et al., 2017).

Quando mantém em foco apenas a carga de superfície das células, os estudos sobre o mecanismo de ação dos PACs deixam uma lacuna a respeito do efeito do campo elétrico criado pela distribuição diferencial de íons entre os meios intra e extracelular, ou seja, o potencial transmembrana.

O potencial transmembrana foi considerado uma força motriz para a internalização de peptídeos catiônicos penetrantes (HENRIQUES; CASTANHO, 2004; ROTHBARD et al., 2004), apresentando grande importância na atividade seletiva de peptídeos antimicrobianos catiônicos, uma vez que o potencial transmembrana é uma das diferenças fundamentais entre as células microbianas e de mamíferos, onde bactérias apresentam um potencial variando de -130 a -150mV e as células de mamíferos de -90 a -110mV (YEAMAN; YOUNT, 2003). Nesse contexto, vários PACs com atividade anticancerígena têm sido estudados pela necessidade de compreender seu modo de ação em relação às membranas celulares.

Os mastoparanos constituem uma interessante classe de peptídeos que se originam do veneno de vespas, sendo classicamente tetradecapeptídeos formados por aminoácidos hidrofóbicos e básicos com um C-terminal amidado. Essas características físico-químicas os categorizam como PACs e favorecem sua conformação como α -hélice quando em contato com bicamadas fosfolipídicas, característica essencial para sua atividade membranolítica, facilitando a penetração celular e toxicidade em várias linhas celulares (ARBUZOVA; SCHWARZ, 1999; KONNO; KAZUMA; NIHEI, 2016; LEE; BAEK; YOON, 2016; SAAR et al., 2005).

Recentemente o nosso grupo de pesquisa mostrou que, dependendo de suas características físico-químicas, peptídeos mastoparanos podem apresentar atividade pró-necrótica contra as células de glioblastoma multiforme (GBM) humano, um tipo muito agressivo de tumor do sistema nervoso central (DA SILVA et al., 2017). Dentre os peptídeos estudados neste trabalho, o Mastoparan-X (MPX) se mostrou bastante potente contra as células de GBM humano.

O MPX vem sendo extensivamente estudado mostrando atividade bactericida, hemolítica (HENRIKSEN et al., 2014) e também contra células leucêmicas (RAYNOR et al., 1992). A atividade do MPX em modelos miméticos de membrana nos fornece informações valiosas sobre o seu modo de ação, indicando que a presença de composições aniônicas e de alterações significantes do potencial transmembrana têm influência na sua atividade (DE KROON; DE GIER; DE KRUIJFF, 1991).

Estudos prévios mostram que o aumento da concentração de íons potássio (K^+) no meio extracelular reduz a eletronegatividade do potencial transmembrana (HÖSLI; ANDRÉS; HÖSLI, 1972; TAMAGAWA; IKEDA, 2017). Baseados neste fato, neste trabalho, realizamos alterações na concentração extracelular de K^+ com a finalidade de alterar o potencial transmembrana das células de GBM humano e entender como este campo elétrico pode interferir na potência citotóxica e/ou membranolítica do peptídeo Mastoparan-X.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura celular: A cultura da linhagem celular T98G (ATCC® CRL-1690™) de glioblastoma multiforme humano foi realizada com meio de cultivo DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. As culturas foram mantidas em incubadora úmida com 5% de CO_2 a 37°C. As mesmas foram submetidas a duas passagens semanais para a manutenção das condições essenciais ao desenvolvimento.

Ensaio de viabilidade celular: A viabilidade celular foi testada utilizando MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A.). Para estes experimentos, 5×10^3 células foram adicionadas em cada poço (em placas de 96 poços), onde foram mantidas por 24h, até o estabelecimento da aderência em placa. Em seguida, as células foram incubadas por 2 horas de duas maneiras: (1) com concentrações molares variáveis de KCl (de 5,4 a 88,3 mmol L⁻¹); (2) com as mesmas concentrações de KCl e tratamento com o peptídeo MPX na concentração de 15 μ mol L⁻¹. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi removido, reposto o meio de cultura limpo com 0,5 mg mL⁻¹ do MTT e incubado por 4h. Após a incubação com o MTT, o conteúdo foi delicadamente removido, adicionou-se DMSO para solubilizar os cristais de sal tetrazólio

gerados na reação e a placa foi levada ao leitor de placas para a leitura da absorbância.

Citometria de Fluxo: Células T98G foram incubadas com 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MPX em diferentes concentrações de KCl extracelular (em mmol L^{-1}): 5,4 (concentração fisiológica encontrada no meio de cultura DMEM) (DULBECCO; FREEMAN, 1959) 26,3 e 46,8. Os procedimentos para citometria de fluxo foram os mesmos que os realizados por Ribeiro-Silva e colaboradores (RIBEIRO-SILVA et al., 2016). Todas as amostras foram analisadas utilizando o FACS Calibur (Becton Dickinson, E.U.A.). Um total de 10.000 células foram compradas por amostra e os dados foram analisados com o software FlowJo V10 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

Ensaio de coloração com iodeto propídio (PI) e Hoechst 33342: Células T98G foram semeadas em placas de 96 poços e coradas por Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e PI (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 2 horas após o tratamento com concentrações de KCl (5,4; 26,3 e 46,8 mmol L^{-1}) e MPX 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os percentuais de células PI positivas de cada grupo foram contados sob um microscópio de fluorescência Leica AM TIRF MC (Leica Microsystems, Alemanha).

Medida de Cálcio Intracelular: A alteração nos níveis de cálcio citoplasmático foi medida conforme descrito previamente (DA SILVA et al., 2017). A fluorescência resultante da marcação de Fluo-4-AM (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) foi avaliada sob um microscópio de fluorescência Leica AM TIRF MC (Leica Microsystems, Alemanha) em células que foram pré-incubadas em 5,4; 26,3 e 46,8 mmol L^{-1} de KCl e tratadas com 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MPX.

Comitê de ética em pesquisa: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - CEP N 658211114, São Paulo, 19 de junho de 2017.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além da carga de superfície de membrana e das características físico-químicas que são inerentes ao peptídeo, o potencial transmembrana pode ter grande contribuição para a potência de atividade dos peptídeos catiônicos.

Levando-se em consideração a diferença de potencial originada pela distribuição de íons entre o meio intra e extracelular, pode-se constatar que a alteração da concentração de K^+ extracelular modifica o potencial transmembrana das células submetidas a este processo (HÖSLI; ANDRÉS; HÖSLI, 1972; TAMAGAWA; IKEDA, 2017). Com base nestas informações, foi realizada a modulação do potencial de membrana das células T98G por meio da adição de gradativas concentrações de cloreto de potássio (KCl) ao fluido extracelular. A fim de avaliar o efeito da alteração do conteúdo de KCl na atividade do MPX, foram realizados experimentos de viabilidade celular, citometria de fluxo, co-incubação de fluoróforos e avaliação de níveis de cálcio intracelular.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando o MTT. Primeiramente foram testadas as concentrações de KCl que poderiam ser utilizadas de forma não citotóxica, sem afetar significativamente a viabilidade das células T98G. Os resultados evidenciaram que para todas as concentrações testadas (de 5,4 a 88,3 mmol L^{-1}) por um período de 2 horas, não houve redução significativa da viabilidade celular.

Foi possível verificar que em concentrações fisiológicas de KCl (5,4 mmol L^{-1}), o tratamento com 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MPX reduziu a viabilidade da população celular pela metade (49,23 \pm 2,57%), e quando aumenta-se a concentração de KCl, a partir de 17,9 mmol L^{-1} , observa-se uma redução da atividade citotóxica do MPX. As concentrações 26,3 e 46,8 mmol L^{-1} de KCl no meio de cultivo das células foram escolhidas para serem estudadas mais detalhadamente, em experimentos que visam avaliar os efeitos específicos do MPX nas células T98G.

Foram observadas alterações morfológicas evidentes, como perda de contorno e alteração da aderência em placa de cultura, para as

células que eram tratadas com o peptídeo MPX em concentrações fisiológicas de KCl. Notamos que, ao se aumentar o conteúdo de KCl, tivemos células com aspectos e contornos mais definidos e compatíveis com o controle não-tratado. Devido a estas alterações observadas por microscopia por contraste interferencial (DIC), procedemos com estudos utilizando a citometria de fluxo para avaliar as alterações morfológicas em populações maiores de células e se o potencial membranolítico do MPX também estava sendo afetado pela alteração eletroquímica.

Por citometria de fluxo, inicialmente foram avaliados os parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade (SSC), onde foi observado que havia uma população de tamanho reduzido para as células tratadas com MPX em concentração fisiológica de KCl e esta população reduziu gradativamente com a adição de concentrações de KCl, aproximando-se às características morfológicas da população do controle não-tratado. Em seguida, foi usado o fluoróforo Iodeto de Propídio (PI) para avaliar a integridade das membranas. O PI que é um fluoróforo impermeável em células intactas, ou seja, quanto maior é o número de células marcadas com este, presumivelmente, é maior a atividade membranolítica do MPX. O inverso também pode ser considerado como verdadeiro. Nas leituras citométricas foi possível observar que cerca de 36% das células T98G que foram tratadas com 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MPX em presença de uma concentração basal de KCl tiveram coloração positiva para PI. A atividade permeabilizante do MPX é reduzida significativamente e proporcional à concentração de KCl adicionada ao meio extracelular, o que é evidenciado pela redução do número de células marcadas pelo PI.

A técnica de microscopia de fluorescência foi aplicada a fim de observar populações menores de células T98G submetidas à co-incubação com os compostos fluorescentes Hoechst 33342 e PI para avaliar a possibilidade de desestruturação da membrana (possivelmente pela formação de poros) do peptídeo MPX em células T98G. O Hoechst 33342 é um fluoróforo que atravessa a membrana das células de forma espontânea, marcando o núcleo de todas as células presentes na cultura, já o PI é uma substância que não entra na célula sem que haja uma descontinuidade de membrana. Desta forma, a co-incubação com estes dois compostos fluorescentes permite realizar o cálculo de porcentagem de células que sofreram o dano de membrana. Este cálculo foi realizado considerando o número de núcleos marcados pelo Hoechst 33342 como o número total de células (100%) no campo e os núcleos corados com PI são contados como células que tiveram a membrana plasmática permeabilizada (% de células coradas).

Na Figura 1 é possível notar que 2 horas de incubação com 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo MPX em concentração fisiológica de KCl (5,4 mmol L^{-1}) causa a permeabilização de aproximadamente 20% das células T98G. As células incubadas com o MPX na presença de 26,3 mmol L^{-1} de KCl apresentaram redução discreta na marcação com PI e as tratadas com MPX em presença de 46,8 mmol L^{-1} de KCl apresentaram uma redução mais pronunciada de células marcadas com PI, mas não de forma estatisticamente significante, indicando que este efeito é uma tendência.

A redução da capacidade membranolítica do peptídeo MPX em células de glioblastoma incubadas com concentrações crescentes de KCl, da mesma maneira, se deve à alteração do potencial transmembrana causada pela maior quantidade de íons K^+ no meio extracelular, o que deixa o meio intracelular menos eletronegativo e reduz a força de atração exercida pelo meio intracelular, consequentemente, reduzindo a atração entre o peptídeo e a bicamada lipídica. Estes resultados concordam com dados mostrados na literatura, onde indicam que a eletronegatividade do meio interno de vesículas fosfolipídicas é fator de grande importância para a atração e interação do peptídeo MPX com a

bicamada fosfolipídica e a formação das descontinuidades de membrana (DE KROON; DE GIER; DE KRUIJFF, 1991).

Além da avaliação da integridade da membrana das células T98G, estes experimentos também providenciaram informações sobre a morfologia nuclear das células tratadas com o MPX na ausência ou presença de altas concentrações de KCl. Ainda na Figura 1, é possível notar que o núcleo das células que se apresentam com dupla marcação (Hoechst e PI positivos), estão na sua forma condensada, emitindo uma fluorescência mais intensa, corroborando com dados publicados anteriormente, onde o MPX está relacionado a efeitos pró-necróticos nas células de GBM humano (DA SILVA et al., 2017).

Observando estes dados, podemos entender que o potencial de membrana tem grande importância na atividade dos peptídeos catiônicos. Yeaman & Yount (2003) mostraram que além de todas as características das membranas das células bacterianas, e as características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos, as diferenças significativas nas características eletroquímicas transmembrana são levadas em consideração como parâmetros adicionais que orientam a toxicidade seletiva destes peptídeos (YEAMAN; YOUNT, 2003).

fisiológica de KCl apresentaram um ganho de aproximadamente 59,1% na intensidade de fluorescência normalizada (normalização considerando o menor nível de fluorescência como zero) se comparadas com as células do controle não tratado. Já as células que foram submetidas ao tratamento com MPX e concentrações elevadas de KCl, mantiveram o nível de fluorescência de acordo com o controle, indicando que o aumento dos íons K^+ no meio extracelular é capaz de reduzir o aumento dos níveis de cálcio intracelular em células T98G induzido pelo MPX. Este efeito “protetor” corrobora com dados da literatura, onde o aumento da concentração extracelular de K^+ (com consequente despolarização do meio intracelular) reduz a taxa de translocação de peptídeos ricos em guanidina para o meio intracelular de linfócitos. Seguindo a mesma lógica, a hiperpolarização da membrana destes linfócitos aumentava a captação do peptídeo estudado, o que indica que alguns peptídeos possuem eficácia altamente dependente do potencial transmembrana (ROTHBARD et al., 2004).

Os resultados deste trabalho, juntamente com os dados presentes na literatura, mostram que o potencial transmembrana pode ter grande importância na potência e atividade de peptídeos catiônicos. Inclusive, sendo relevante no direcionamento para a seletividade de peptídeos anticâncer.

CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, esses achados destacam que a potência membranólítica do peptídeo Mastoparan-X, além de estar associada às suas características estruturais e à presença de fosfolípidios negativamente carregados no folheto mais externo das membranas das células cancerosas, está fortemente associada ao campo elétrico gerado pela diferença de composição iônica através da membrana. Além disso, podemos considerar o MPX em estudos futuros sobre o potencial uso de peptídeos como biomoléculas anticâncer.

REFERÊNCIAS

- ARBUZOVA, A.; SCHWARZ, G. Pore-forming action of mastoparan peptides on liposomes: A quantitative analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1420, n. 1-2, p. 139-152, 1999.
- BIRGE, R. B. et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death and Differentiation*, v. 23, n. 6, p. 1-17, 2016.
- DA SILVA, A. M. B. et al. Pro-necrotic Activity of Cationic Mastoparan Peptides in Human Glioblastoma Multiforme Cells Via Membranolytic Action. *Molecular Neurobiology*, 2017.
- DE KROON, A. I. P. M.; DE GIER, J.; DE KRUIJFF, B. The effect of a membrane potential on the interaction of mastoparan X, a mitochondrial presequence, and several regulatory peptides with phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1068, n. 2, p. 111-124, 1991.
- DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. Influence of the Bilayer Composition on the Binding and Membrane Disrupting Effect of Polybia-MP1, an Antimicrobial Mastoparan Peptide with Leukemic T-Lymphocyte Cell Selectivity. *Biochemistry*, v. 51, n. 24, p. 4898-4908, 19 jun. 2012.
- DULBECCO, R.; FREEMAN, G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, v. 8, n. 3, p. 396-397, jul. 1959.
- FELÍCIO, M. R. et al. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry*, v. 5, n. February, p. 1-9, 2017.
- GABERNET, G. et al. Membranolytic anticancer peptides. *MedChemComm*, v. 7, n. 12, p. 2232-2245, 2016.
- HENRIKSEN, J. R. et al. Side Chain Hydrophobicity Modulates Therapeutic Activity and Membrane Selectivity of Antimicrobial Peptide Mastoparan-X. v. 9, n. 3, p. 1-9, 2014.
- HENRIQUES, S. T.; CASTANHO, M. A. R. B. Consequences of nonlytic membrane perturbation to the translocation of the cell penetrating peptide pep-1 in lipidic vesicles. *Biochemistry*, v. 43, n. 30, p. 9716-9724, 2004.

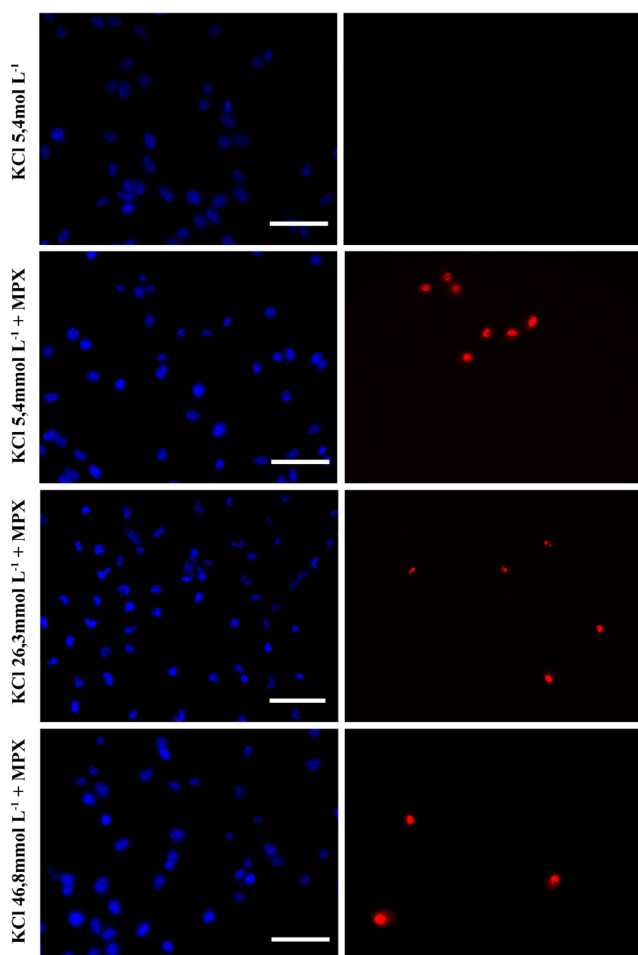


Figura 1. Imagens representativas mostrando as células T98G co-incubadas e marcadas com Hoechst 33342 (esquerda, em azul) e a com PI (direita, em vermelho). Barras de escala = 50 μ m.

Em estudo anterior (DA SILVA et al., 2017) foi observado que os peptídeos mastoparanos induzem o aumento dos níveis de cálcio no meio interno das células T98G de GBM humano. Desta forma, os níveis de cálcio intracelular das células tratadas foram analisados por meio de microscopia de fluorescência. As células T98G tratadas pelo período de 2 horas com 15 μ mol L^{-1} de MPX em concentração

- HÖSLI, L.; ANDRÈS, P. F.; HÖSLI, E. Effects of Potassium on the Membrane Potential of Spinal Neurones in Tissue Culture. *Pflügers Archive*, v. 333, p. 362-365, 1972.
- KONNO, K.; KAZUMA, K.; NIHEI, K.-I. Peptide Toxins in Solitary Wasp Venoms. *Toxins*, v. 8, n. 4, p. 114, 2016.
- LEE, S. H.; BAEK, J. H.; YOON, K. A. Differential properties of venom peptides and proteins in solitary vs. Social hunting wasps. *Toxins*, v. 8, n. 2, p. 1-29, 2016.
- RAYNOR, R. L. et al. Membrane interactions of mastoparan analogues related to their differential effects on protein kinase C, Na, K-ATPase and HL60 cells. *FEBS letters*, v. 307, n. 3, p. 275-9, 1992.
- RIBEIRO-SILVA, L. et al. Voltage-Gated Proton Channel in Human Glioblastoma Multiforme Cells. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 7, n. 7, p. 864-869, 20 jul. 2016.
- ROTHBARD, J. B. et al. Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidium-Rich Peptides into Cells. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, n. 31, p. 9506-9507, 2004.
- SAAR, K. et al. Cell-penetrating peptides: A comparative membrane toxicity study. *Analytical Biochemistry*, v. 345, n. 1, p. 55-65, 2005.
- SCHWEIZER, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *European journal of pharmacology*, v. 625, n. 1-3, p. 190-4, 25 dez. 2009.
- SOUZA, B. M. DE et al. Structure-activity relationship of mastoparan analogs: Effects of the number and positioning of Lys residues on secondary structure, interaction with membrane-mimetic systems and biological activity. *Peptides*, p. 39-41, 2015.
- TAMAGAWA, H.; IKEDA, K. Generation of membrane potential beyond the conceptual range of Donnan theory and Goldman-Hodgkin-Katz equation. *Journal of Biological Physics*, p. 4-21, 2017.
- WALLBRECHER, R. et al. Membrane permeation of arginine-rich cell-penetrating peptides independent of transmembrane potential as a function of lipid composition and membrane fluidity. *Journal of Controlled Release*, v. 256, n. April, p. 68-78, 2017.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, v. 55, n. 1, p. 27-55, 1 mar. 2003.