

PROJETO PIBIC Abril 2023

Desenvolvimento de plataforma de estudo *in vitro* de metástase cerebral de células tumorais de mama

Pesquisador Responsável	Co-orientadora	Unidade do CNPEM
Sandra Martha Gomes Dias	Renata Spagolla Napoleão Tavares	Será realizado no LNBio

1. Introdução

O câncer de mama possui alguns subtipos tumorais que apresentam organotropismo de metástase para o cérebro, capacidade esta relacionada com uma alta taxa de mortalidade da doença. Atualmente, os estudos pré-clínicos de metástase cerebral se baseiam em modelos animais, o que dificulta a manipulação genética do tumor em camundongos, dentre outras dificuldades. O câncer de mama triplo negativo (TN, negativo para receptor de estrógeno, ER, receptor de progesterona, PR e sem amplificação de HER2) é um tumor com altos índices de metástase cerebral¹.

O projeto visa, primeiramente, desenvolver uma plataforma de estudo *in vitro* de invasão de células tumorais de mama frente a barreira hemato encefálica (BHE). O desenvolvimento deste modelo acontecerá em etapas. O projeto de iniciação científica contemplará as seguintes etapas:

1. Caracterizar os cultivos 2D e 3D da linhagem TN MDA-MB-231 selecionada para apresentar metástase cerebral (MDA-MB-231Br-GFP).
2. Confirmar, *in vivo*, o tropismo de MDA-MB-231Br para o cérebro.
3. Estabelecer um sistema estático de inserto (câmara de Boyden) contendo modelo tumoral na câmara superior e BHE justaposta a membrana do inserto na câmara inferior. Células da linhagem que tenham capacidade de ultrapassar a BHE (formada de células endoteliais e astrócitos) serão detectados no compartimento abaixo do inserto pelo sinal de fluorescência de GFP.
4. Células de MDA_MB-231Br que ultrapassaram a BHE e células que não ultrapassaram serão avaliadas quanto a expressão de marcadores identificados na literatura (especialmente integrinas) assim como aqueles que identificarmos na avaliação de dados públicos de transcriptômica de pacientes de câncer de mama com metástase cerebral (TCGA).

2. Estado da Arte

O câncer de mama exibe padrões metastáticos com tropismos distintos que depende dos subtipos tumorais. Osso, pulmão, fígado e cérebro são os órgãos-alvo comuns para metástases de câncer de mama, além de linfonodos distantes². Porém, para a maior parte dos casos de câncer de mama, os ossos são predominantemente afetados enquanto o cérebro é menos afetado. Por outro lado, quando se trata do tipo triplo-negativo, dentre os órgãos mais afetados estão o cérebro e os pulmões, este apresenta o pior prognóstico justamente por ter alta taxa de metástase com pico do primeiro ao segundo ano e praticamente todas as demais metástases ocorrendo dentro de cinco anos².

O tratamento direcionado para o câncer de mama metastático é determinado pela presença ou ausência dos receptores hormonais (receptor de estrogênio, receptor de progesterona), amplificação ou não de HER2, recorrência do câncer, taxa de metástase e local da metástase. Em particular, o tratamento personalizado para pacientes pode aumentar a eficácia terapêutica e minimizar a toxicidade induzida pela quimioterapia no câncer de mama ³.

Recentemente, várias terapias para tumores primários ou metastáticos de câncer de mama foram aprovadas pelo FDA, sendo elas terapias sistêmicas hormonais, citotóxicas ou tendo HER2 com alvo ⁴. Enquanto tumores primários TN são tratados com Paclitaxel, Belinostat, 5-azacitidine, Tocilizumab, os metastáticos são tratados com Doxorubicin, Epirubicin, Cyclofosfamida, Vorinostat, Zemetostat, Atezolizumab associado a Paclitaxel (para TN com alvo em PD-L1), Metotrexato, Tivozanib, Palbociclib. Com relação a tumores de mama HER2+, os fármacos Trastuzumab, Lapatinib, e Pertuzumab são empregados ³.

Apesar da importância de metástase do câncer de mama, as pesquisas têm focado na transformação oncogênica de tumores primários e muito ainda falta para o entendimento do processo e suas vias de sinalização durante a metástase deste tipo de câncer para o cérebro ⁵.

Nos últimos anos, uma gama de estudos usou princípios de microengenharia para investigar os mecanismos de invasão de células do câncer de mama, intravasamento, extravasamento, organotropismo de metástase de câncer de mama e formação de nicho metastático⁵.

As células oriundas do câncer de mama têm o potencial de intravasar paracelularmente, ou seja, via junções endoteliais, junções de aderência, *tight junctions*, ou via transporte celular frente a uma barreira endotelial⁵. Até o momento, nenhum modelo foi desenvolvido contemplando estas três fases do processo da doença (invasão, circulação e extravasamento). Após desenvolvido, este modelo será de grande valia para a identificação de vias e alvos relevantes para o processo e, desta maneira, facilitar o desenvolvimento de medidas terapêuticas mais efetivas.

3. Objetivos

Identificar vias chaves que possam estar alteradas no processo de metástase cerebral oriunda de células tumorais de mama.

1. Comprovar do tropismo cerebral da linhagem cerebral MDA-MB-231BR-eGFP em modelo animal e posteriormente *in vitro* em câmara de Boyden com BHE cultivada em membrana;
2. Desenvolver habilidades em histologia (criocortes, coloração, imunofluorescência, imunohistoquímica);
3. Avaliar expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real para caracterização das células tumorais pré e pós invasão;
4. Bioinformática: Analisar bancos de dados públicos de transcriptômica de pacientes e dados prévios de RNA-seq do modelo MDA-MB-231BR-eGFP para busca de novos alvos modulados em modelos metastáticos;

4. Metodologia

CULTIVO DE MDA-MB-231BR

Utilizaremos a linhagem de câncer de mama triplo-negativa MDA-MB-231BR, derivada da MDA-MB-231, com capacidade de metástase para o cérebro gentilmente cedida pela Pesquisadora Patrícia Steeg (National Cancer Institute, EUA)⁶. Esta célula foi previamente transduzida para produzir a proteína Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), tornando-se a MDA-MB-231BR-eGFP. Essas células serão cultivadas em DMEM contendo 1000 mg/L de glicose, 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB. Usaremos essas células para realizar ensaio animal, a fim de verificar tropismo cerebral e posteriormente realizaremos o ensaio de invasão *in vitro*.

ENSAIO DE METÁSTASE IN VIVO

As células MDA-MB-231BR serão tripsinizadas com 0.05% tripsina e 0,02% EDTA por 15min e serão ressuspendidas em PBS. Inocularemos em camundongos nude (BALB/c-nu/nu; NCI) previamente anestesiados, 0,1 milhões de células tumorais em 100 μ L PBS na glândula mamária (ortotópico). Os animais serão monitorados ao longo do tempo e eutanasiados em torno de 14 dias após a inoculação, ou antes, em caso de prostração ou redução de peso. Realizaremos os experimentos após aprovação do protocolo pela CEUA – CNPEM.

MODELO DE BHE

As células de endoteliais cerebrais (hCMEC/D3) serão cultivadas em EBM-2 (Lonza, #190860) suplementado com EGM-2 kit (Lonza # CC-4176). As células serão plaqueadas após expansão em inserto de poro 0,8 μ m de (Millipore, Merck) para placas de 24 poços revestido com colágeno tipo I até formarem monocamada confluenta. Caracterização do modelo avaliará a resistência elétrica transepitelial (TEER) da monocamada em interface ar-líquido que deverá ser em torno de 40 Ω cm²⁷. Células serão semeadas em inserto revestido com matriz para definir número de células adequado para o maior TEER no modelo de BHE. Membrana do inserto será caracterizada por imunofluorescência para proteínas de junções oclusivas. Células endoteliais poderão ser cultivadas em co-cultivo com astrócitos.

ENSAIO DE METÁSTASE IN VITRO

Em posse do modelo de BHE definido, iremos adicionar as células tumorais em lado oposto ao da BHE afim de realizar o ensaio de invasão *in vitro* (câmara boyden). Neste ensaio, os poros da membrana de um inserto bloqueado com matriz será a barreira para conter as células tumorais, e a presença da BHE por possuir moléculas de adesão em sua superfície funcionarão como substrato de ancoragem. A taxa de invasão é determinada pela contagem das células que atravessaram a membrana permeável e a BHE, cultivada do lado oposto ao das células tumorais⁸.

EXTRAÇÃO DE RNA E PCR QUANTITATIVA

O RNA total das células antes e após a invasão será extraído utilizando o TRI Reagent[®] (Sigma) e a produção da primeira fita de cDNA feita utilizando mix de hexâmetros randômicos (Life Technologies) com Oligo dT (NEB), em 7 partes para 5, e

GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), seguindo instruções dos fabricantes. A quantificação dos transcritos será realizada em triplicata técnica com o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) seguindo instruções do fabricante. Os dados serão normalizados pela expressão do housekeeping 18S rRNA. Será utilizado o método comparativo 2- $\Delta\Delta C_t$ 209 para quantificação da expressão. Os primers utilizados para a quantificação dos transcritos serão relacionados a moléculas de adesão e integrinas relacionadas a metástase.

BIOINFORMÁTICA

Otimizaremos os scripts em R e FIJI para a quantificação crescimento de dos cultivos 3D, bem como realizaremos busca de genes alvo de metástase em células MDA-MB-231BReGFP.

REFERÊNCIAS

1. Pedrosa, R. M. S. M., Mustafa, D. A., Soffietti, R. & Kros, J. M. Neuro-Oncology and directions for treatment. **20**, 1439–1449 (2018).
2. Jin, X. & Mu, P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* **9s1**, BCBCR.S25460 (2015).
3. Park, M. *et al.* Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 6806 (2022).
4. Sachs, N. *et al.* A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* **172**, 373-386.e10 (2018).
5. Sigdel, I. *et al.* Biomimetic Microfluidic Platforms for the Assessment of Breast Cancer Metastasis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, (2021).
6. Yoneda, T., Williams, P. J., Hiraga, T., Niewolna, M. & Nishimura, R. A Bone-Seeking Clone Exhibits Different Biological Properties from the MDA-MB-231 Parental Human Breast Cancer Cells and a Brain-Seeking Clone In Vivo and In Vitro. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1486–1495 (2001).
7. Koenig, L. *et al.* A Human Stem Cell-Derived Brain-Liver Chip for Assessing Blood-Brain-Barrier Permeation of Pharmaceutical Drugs. (2022).
8. Marshall, J. Transwell® Invasion Assays. in 97–110 (2011). doi:10.1007/978-1-61779-207-6_8.