

## Produção de matriz extracelular mineralizada de osteoblastos para estudos de interação com células de tumor de mama

Victória B. D. Agostinho<sup>1</sup>, Milene N. O. Moritz<sup>2</sup>, Heloísa S. S. Araújo<sup>3</sup>.

1. Estudante de IC do Depto. de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar; \*vic\_agostinho@hotmail.com
2. Doutoranda do Depto. de Ciências Fisiológicas, UFSCar, São Carlos/SP
3. Docente Pesquisadora do Depto. de Ciências Fisiológicas, UFSCar, São Carlos/SP

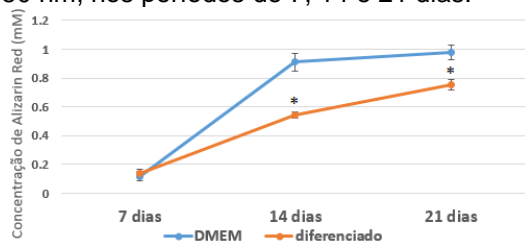
Palavras Chave: *osteoblastos, matriz extracelular, metástase óssea mamária.*

### Introdução

As metástases são responsáveis pela morte da maioria dos pacientes de câncer. Dentre os sítios metastáticos observados em pacientes com câncer de mama, o tecido ósseo é o de maior incidência. A matriz extracelular desempenha grande papel no comportamento celular e também no desenvolvimento tumoral, regulando processos de adesão e desadesão das células aos tecidos, através das integrinas. A integrina  $\alpha\beta 1$  é o principal receptor de colágeno tipo I e é essencial nos processos de adesão celular à matriz. As integrinas podem ser inibidas por desintegrinas, pequenas proteínas encontradas no veneno de serpentes. A ALT-C é uma desintegrina purificada a partir do veneno da serpente *Bothrops alternatus*, e interage fortemente com a integrina  $\alpha\beta 1$ . Este estudo tem por objetivo caracterizar a formação de matriz extracelular de osteoblastos da linhagem Mg-63, e observar o efeito da ALT-C na adesão entre células tumorais de mama (MDA-MB-231) e a matriz extracelular produzida *in vitro* por estes osteoblastos. Para isso, a desintegrina ALT-C foi purificada por cromatografia; os osteoblastos foram cultivados em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibióticos; para indução à formação de matriz extracelular os osteoblastos foram cultivados em meio diferenciado (DMEM acrescido de ácido ascórbico 2-fosfato e  $\beta$ -glicerol fosfato) por 21 dias; e ensaio de adesão estática foi realizado entre as duas linhagens celulares.

### Resultados e Discussão

A matriz extracelular foi fixada e posteriormente corada com Alizarin Red para quantificação da deposição de cálcio, medindo-se a absorbância no comprimento de onda 550 nm, nos períodos de 7, 14 e 21 dias.



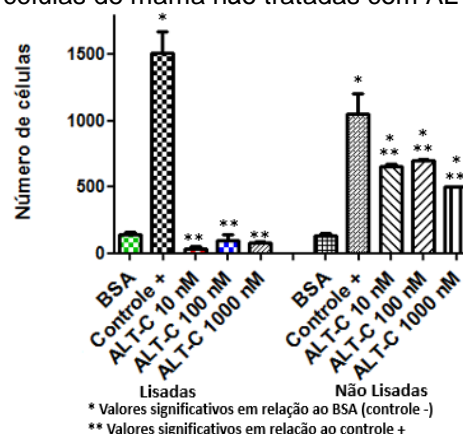
\* Valores significativamente menores em relação ao DMEM no mesmo período

**Figura 1.** Quantificação da Matriz Extracelular produzida por osteoblastos. Testes estatísticos: ANOVA seguido de Tukey.

Os resultados observados mostram que a quantidade de cálcio depositada na matriz extracelular aumenta em função do tempo, porém observa-se maior deposição de cálcio nas células cultivadas em meio normal do que nas cultivadas em meio diferenciado. O fato da Mg-63 ser uma linhagem tumoral, e portanto ter muitos dos seus processos metabólicos exacerbados, pode explicar a não

necessidade de meio diferenciado para maior produção de matriz.

O ensaio de adesão estática foi realizado cultivando-se a Mg-63 por 21 dias em meio diferenciado ( $10^4$  células/poço). Os osteoblastos plaqueados foram divididos em 2 grupos: lisados com água miliQ por 10 minutos, e não lisados. As células MDA-MB-231 foram tratadas com ALT-C nas concentrações 10 nM, 100 nM e 1000 nM. As células tumorais de mama foram incubadas junto aos osteoblastos ou só à matriz deles por 30 minutos à 37°C. Para controle negativo foi usado BSA, e como controle positivo foram usadas células de mama não tratadas com ALT-C.



**Figura 2.** Ensaio de Adesão Estática entre células tumorais de mama e osteoblastos lisados e não-lisados. Testes estatísticos: ANOVA seguido de Tukey.

Observa-se que há inibição da adesão em todas as condições testadas, porém ocorre maior inibição quando os osteoblastos estão lisados, comparado às células íntegras. Hipotetiza-se que a matriz com osteoblastos propicia um microambiente mais adesivo para as células tumorais por ser mais complexa comparado ao microambiente com osteoblastos lisados, em que há apenas matriz extracelular.

### Conclusões

Conclui-se que a linhagem Mg-63 não necessita meio diferenciado para que haja maior mineralização da sua matriz extracelular. O ensaio de adesão estática demonstra que a ALT-C inibe a adesão das células tumorais de mama aos osteoblastos e sua matriz, nas três concentrações testadas.

### Agradecimentos

À FAPESP (Processo 2013/00798-2) e CNPq.

COLEMAN, R. E.; RUBENS, R. D. The clinical course of bone metastases from breast cancer. *British journal of cancer*, v. 55, n. 1, p. 61–6, jan. 1987.  
 GUO, W.; GIANCOTTI, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 5, n. 10, p. 816–26, out. 2004.  
 SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. *et al.* Snake venom disintegrins and cell migration. *Toxins*, v. 2, n. 11, p. 2606–21, nov. 2010.