

# CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE NEURITOS EXPOSTOS AO PACLITAXEL E IMPLICAÇÕES DO GENE *FGD4*

Elias, A. B. R.(ME)<sup>1</sup>, Kroetz, D.<sup>3</sup>, Suarez-Kurtz, G<sup>1</sup>, Carvalho, M.A.<sup>1,2</sup>, Fuchshuber-Moraes, M<sup>1</sup>

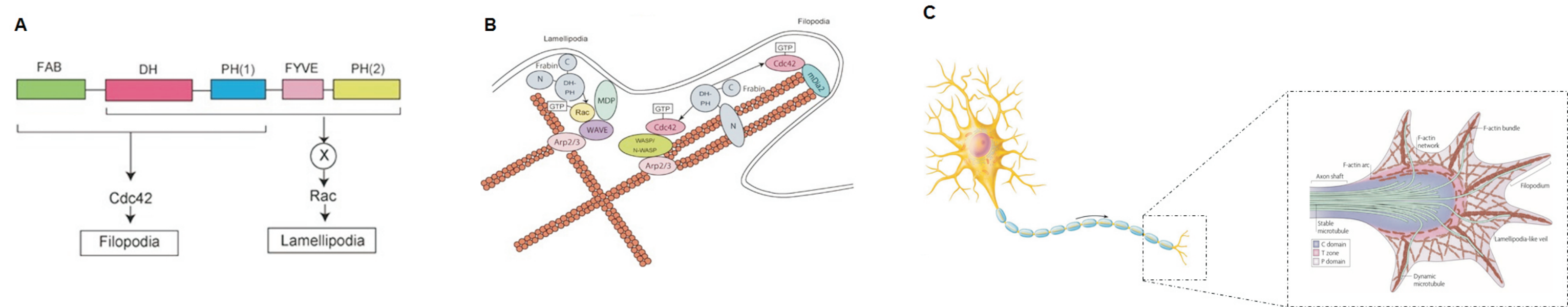
<sup>1</sup>Laboratório de Farmacologia – CPQ/SPC- INCA,

<sup>2</sup>Instituto Federal de Ciencia e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ,

<sup>3</sup>Department of Bioengineering and Therapeutical Sciences – UCSF, San Francisco, California, EUA

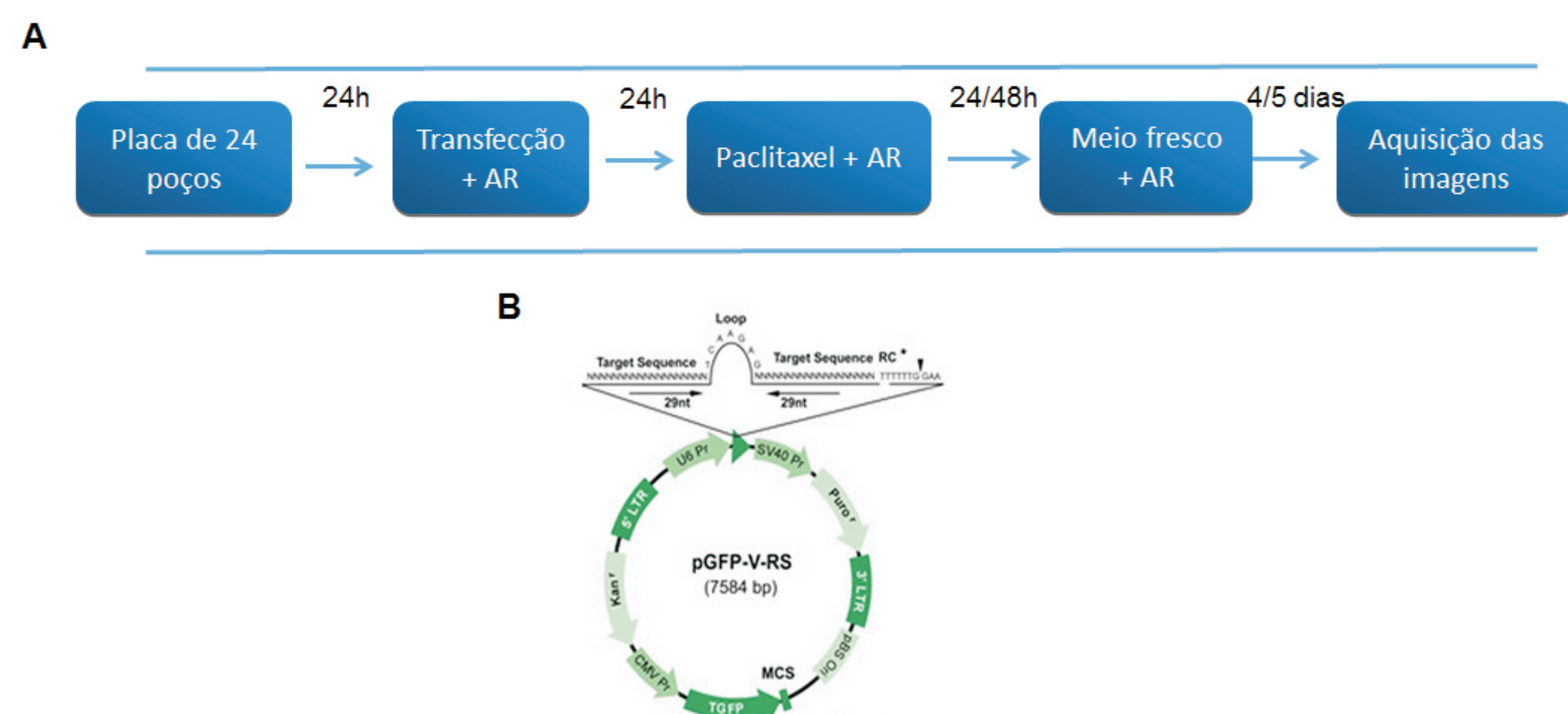
## INTRODUÇÃO

O Paclitaxel é um quimioterápico amplamente utilizado hoje em dia, atuando como um inibidor mitótico. Seu mecanismo de ação se dá através da sua interação com a subunidade de b-tubulina, estabilizando as estruturas de microtúbulos. Porém um dos seus principais efeitos tóxicos é o desenvolvimento da Neuropatia Sensorial Periférica (NSP), que acomete subgrupos de pacientes em tratamento com o fármaco, sendo um fator dose-limitante. Um estudo de associação genômica em larga escala mostrou uma possível associação do gene *FGD4* com o desenvolvimento da NSP induzida por paclitaxel. Além disso, mutações neste gene estariam relacionadas com a síndrome de Charcot-Marie-Tooth 4H, uma síndrome neuropática periférica. Com isso, o objetivo deste estudo é investigar o papel do gene *FGD4* no desenvolvimento estrutural e funcional de neuritos em células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas ao paclitaxel, como um modelo de neurotoxicidade induzida por quimioterápico.



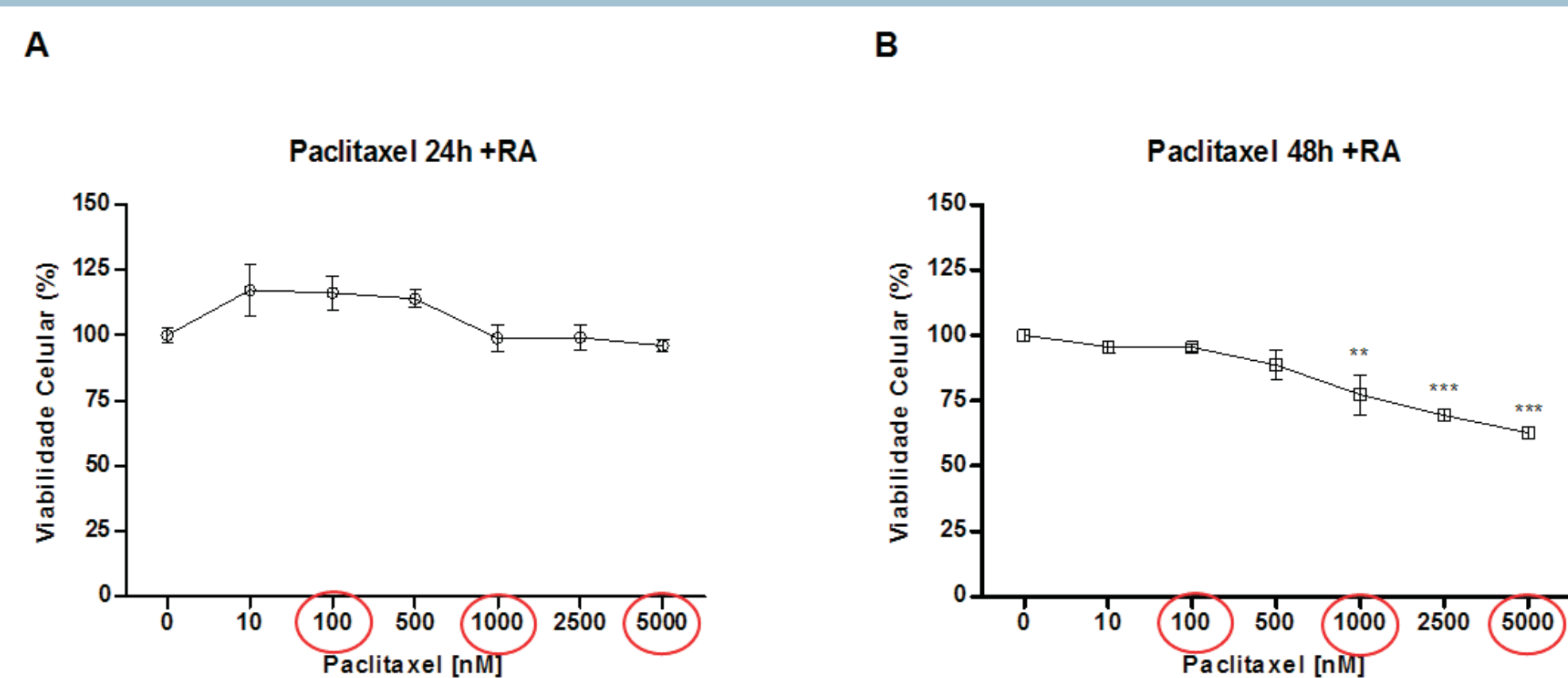
**FIGURA 1: ESTRUTURA E FUNÇÃO DA FRABINA NA ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO DE ACTINA:** (A) Organização dos domínios da Frabina. (B) Os domínios FAB (N), DH e PH(1) interagem diretamente com Cdc42 levando à sua ativação e formação de filopódios. Os domínios DH, PH(1), FYVE e PH(2) interagem indiretamente com Rac1, levando à formação de lamelipódios. Adaptado de Nakanishi e Takai, (2008). (C) Organização do citoesqueleto de actina na formação de filopódios e lamelipódios no cone de crescimento dos axônios. Adaptado de Lowery and Vactor, 2009

## METODOLOGIA

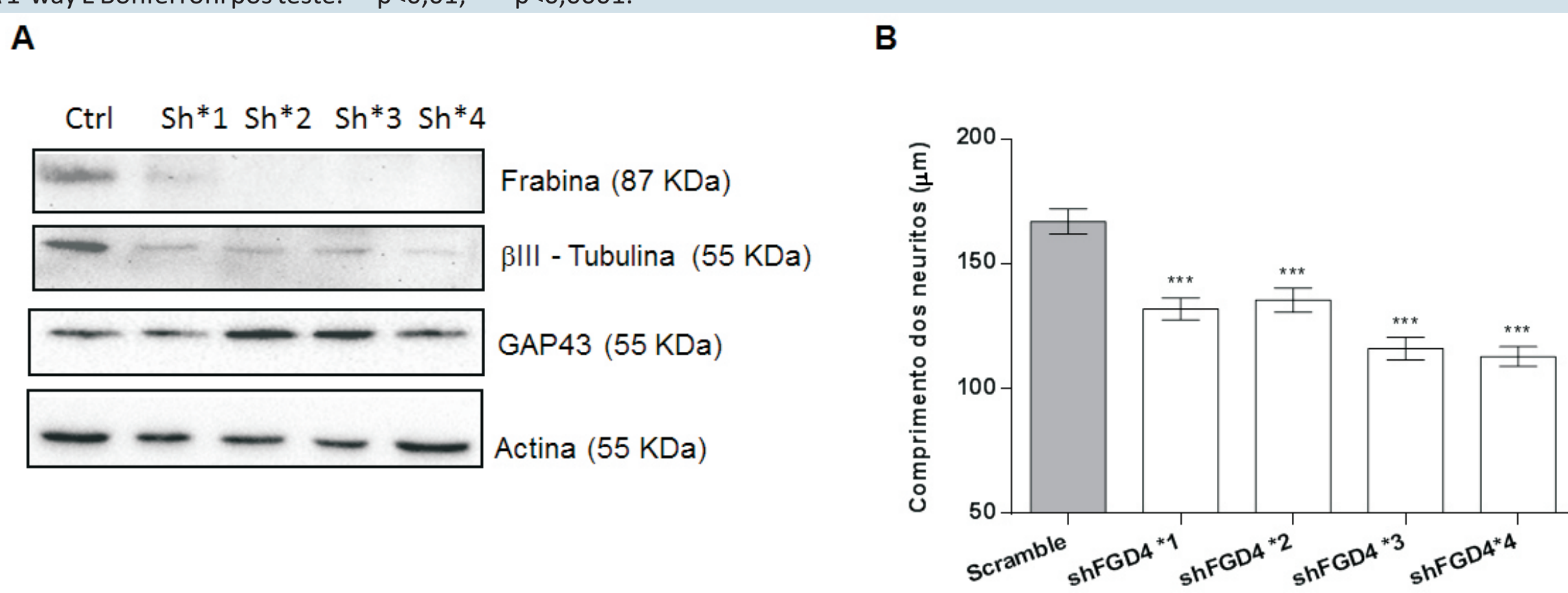


**FIGURA 2: ESQUEMA EXPLICATIVO DA SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL:** (A) Células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram transfectadas e tratadas com 10 nM de AR para desenvolvimento de um fenótipo neuronal. (B) Mapa do vetor retroviral contendo as sequências de silenciamento shRNA específicas para o gene *FGD4* e uma sequência não relacionada (*Scramble*) como controle.

## RESULTADOS



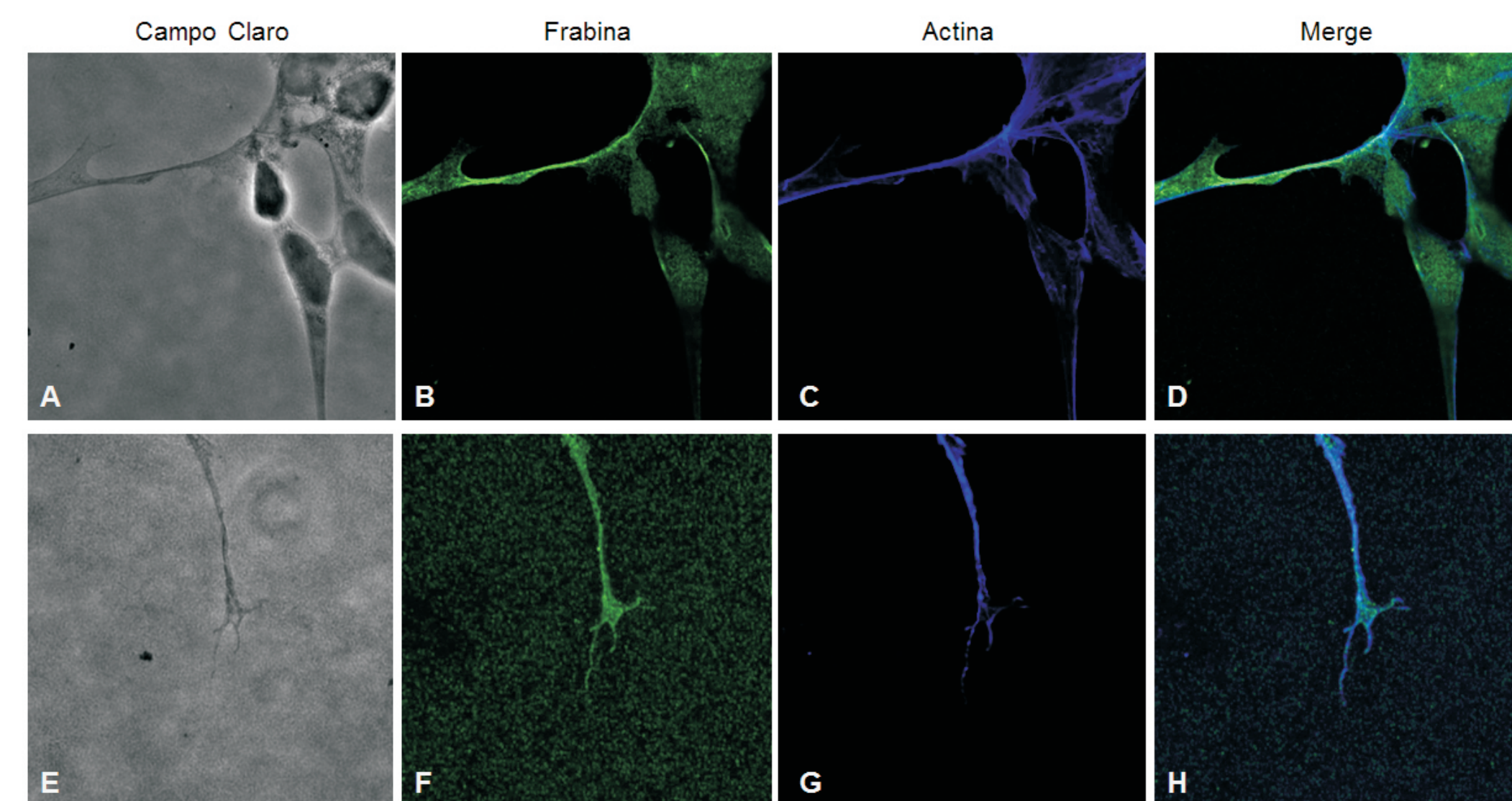
**FIGURA 3 : ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR:** As células foram tratadas por 24 e 48h com paclitaxel para determinação do perfil de resistência ao fármaco e escolhas das concentrações do quimioterápico a ser utilizadas nos experimentos futuros. (A) Após 24 horas de tratamento com paclitaxel não houve reduções significativas na viabilidade celular. (B) Nas células tratadas por 48 horas com paclitaxel foi possível observar reduções estatisticamente significativas na viabilidade celular a partir da concentração de 1000 nM. Média ± DP, N=2. ANOVA 1-way e Bonferroni pós teste. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,0001.



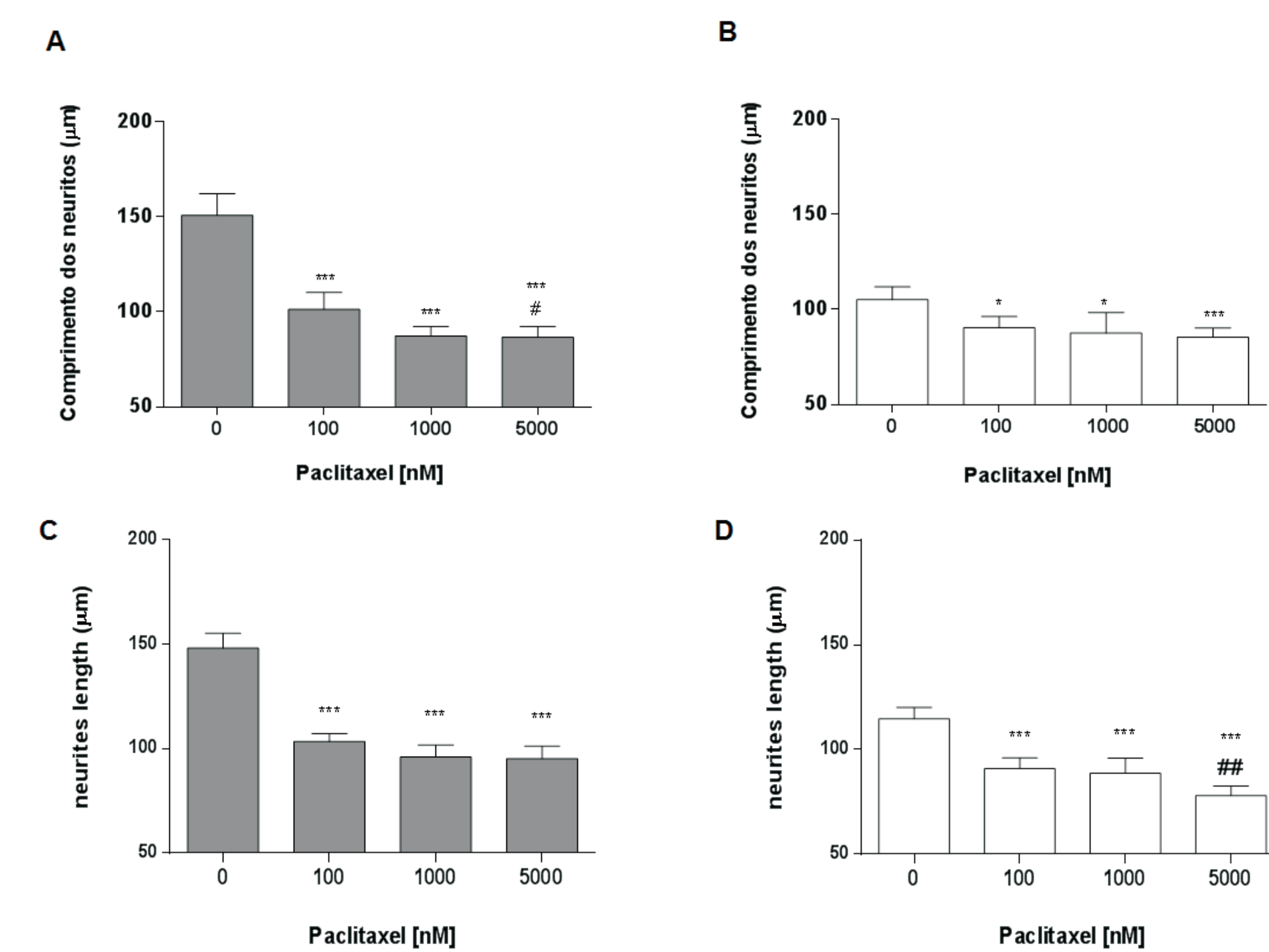
**FIGURA 4: CARACTERIZAÇÃO DO MODELO:** (A) Todas as construções de shRNA utilizadas levaram ao um diminuição da expressão da proteína Frabina. A expressão do marcador neuronal βIII-tubulina parece diminuir com o silenciamento do gene *FGD4*. Já a expressão do GAP43 parece ter um leve aumento na maioria das células silenciadas, representando um possível dano neuronal. (B) Células foram transfectadas com as quatro construções de shRNA específicas para *FGD4* e seus neuritos foram medidos após 7 dias de diferenciação. Todas as construções apresentaram reduções estatisticamente significativas no comprimento dos neuritos quando comparada com o grupo *scramble*. Foram medidos cerca de 120 neuritos por condição. Média ± ER. T teste, \*\*\*p<0,0001.



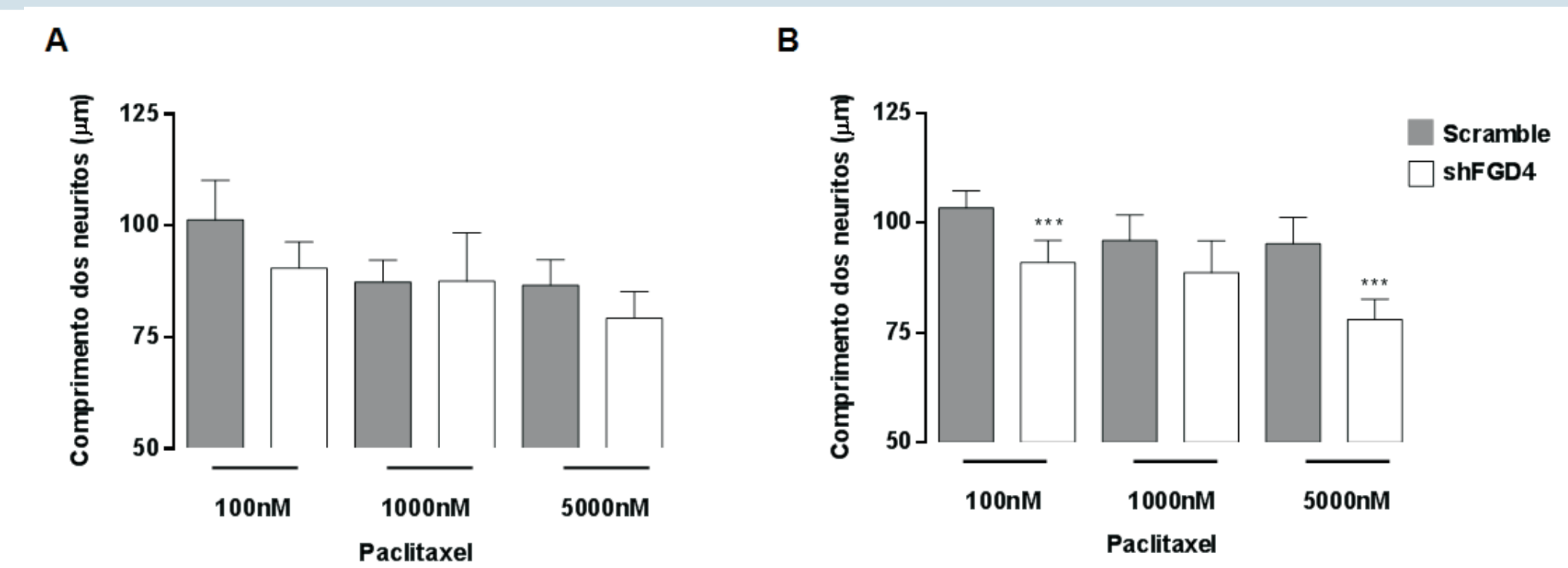
**FIGURA 5: IMUNOMARCAÇÃO PARA FRABINA E DAPI** (A) Sobreposição do campo claro com a marcação para Frabina e DAPI. (B) Cone de crescimento celular com marcação específica para Frabina. (C) DAPI. (D) Campo claro. É possível observar a localização da Frabina ao longo dos neuritos (seta), assim como no cone de crescimento (ponta de seta). Aumento de 1200x.



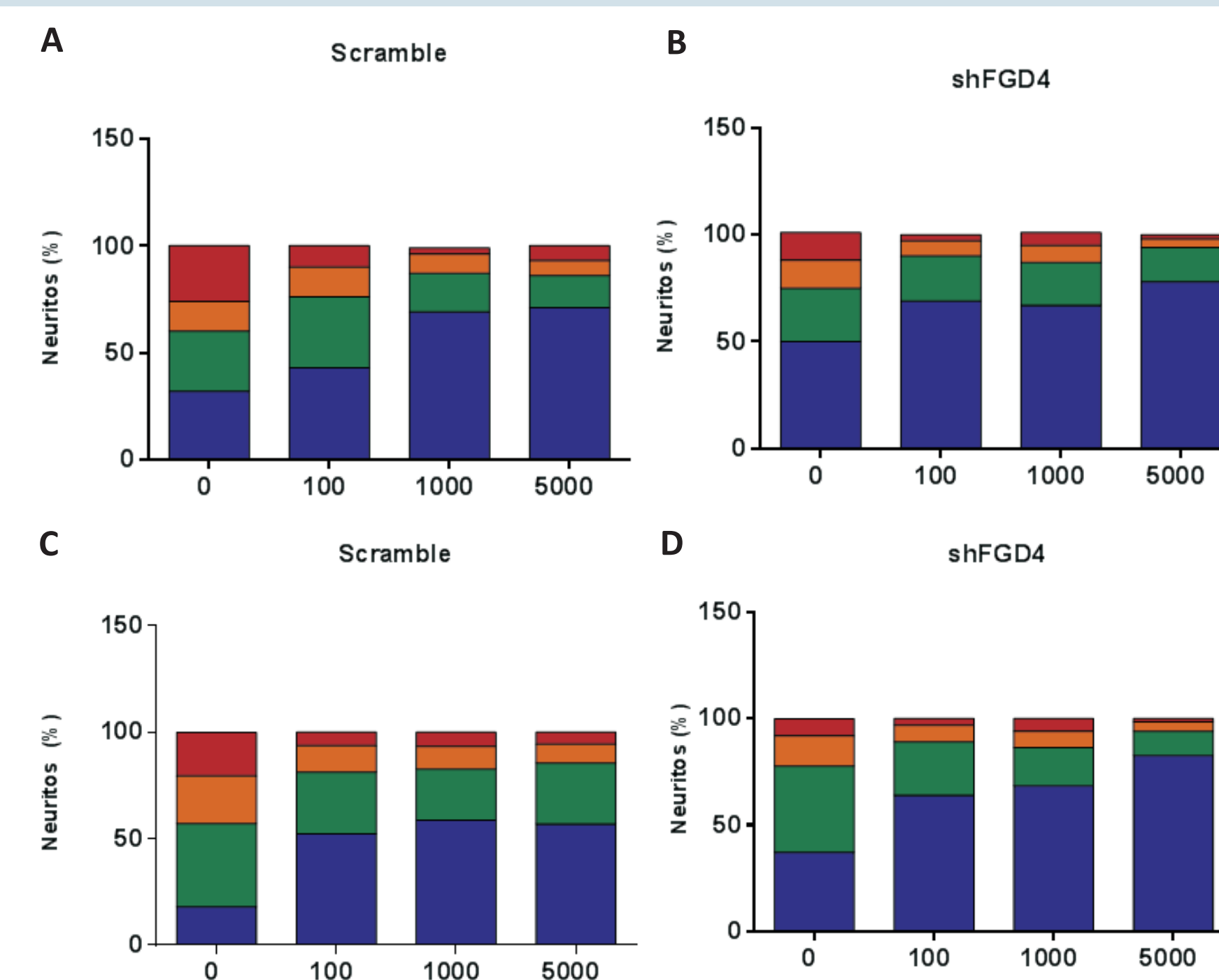
**FIGURA 6: IMUNOMARCAÇÃO PARA ACTINA E FRABINA:** (A, E) Imagem de campo claro das células SH-SY5Y. (B, F) Marcação específica para Frabina. (C, G) Marcação específica para actina utilizando faloidina conjugada a fluoróforo. (D, H) Sobreposição das marcações para Frabina e Actina. É possível observar uma co-localização da actina e da Frabina ao longo dos neuritos observados, assim como no cone de crescimento destes neuritos. Sugerindo uma possível interação entre ambas as estruturas. Aumento de 1200x.



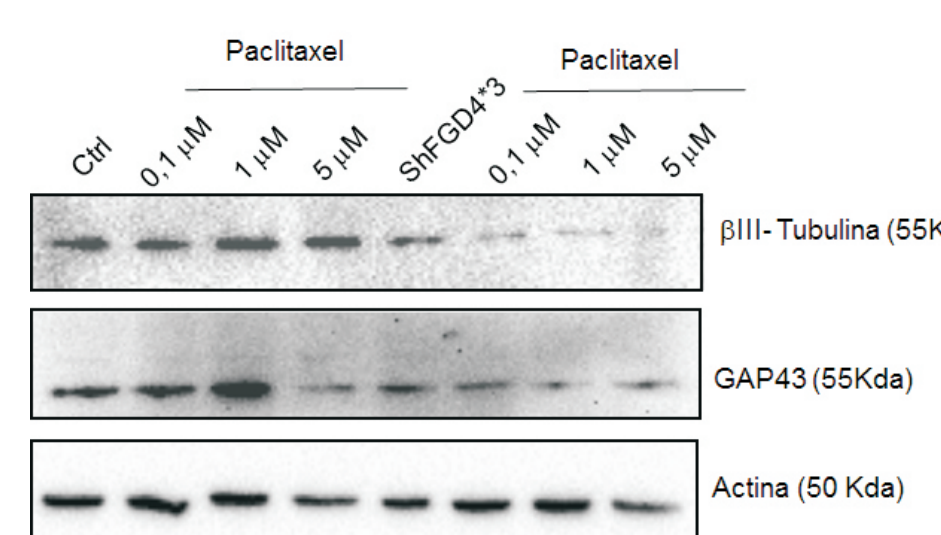
**FIGURA 7: CÉLULAS SCRAMBLE E SILENCIADAS TRATADAS POR 24 E 48 HORAS COM PACLITAXEL** (A e C) Células *scramble* tratadas por 24 e 48 horas com paclitaxel, respectivamente. Foram observadas reduções estatisticamente significativas no comprimento dos neuritos das células tratadas com paclitaxel para todas as concentrações em relação às células controle sem tratamento. (B e D) Células silenciadas para o gene *FGD4* e tratadas por 24 e 48 horas, respectivamente. Também foi possível observar reduções estatisticamente significativas nos comprimentos dos neuritos em todas as concentrações trabalhadas quando comparadas às células silenciadas sem tratamento. Média ± EP, N=3. ANOVA 1-way e teste de Bonferroni. \*\*\*p<0,0001.



**FIGURA 8: COMPARAÇÃO DOS NEURITOS ENTRE OS GRUPOS SCRAMBLE E SILENCIADO:** (A) Grupos *scramble* e shFGD4 tratados por 24 horas com paclitaxel. Não foram observadas reduções estatisticamente significativas no comprimento dos neuritos das células silenciadas em relação a *scramble* em todas as concentrações utilizadas. (B) Grupo *scramble* e shFGD4 tratados por 48h com paclitaxel. Foram observadas reduções nos comprimentos dos neuritos nas células silenciadas em relação às células *scramble* nas concentrações de 0, 100 e 500nM de paclitaxel. Sendo essa redução mais acentuada no grupo sem tratamento. A concentração de 1000 nM não apresentou reduções significativas. Média ± EP, N=3. Teste T. \*\*\*p<0,0001.



**FIGURA 9: DISTRIBUIÇÃO DE NEURITOS POR FAIXA DE TAMANHO:** (A, B) Células *scramble* não tratadas apresentaram a maioria dos neuritos maiores que 100µm, diferentemente das células tratadas com paclitaxel por 24 e 48 horas que a maioria dos seus neuritos considerados pequenos. O número de neuritos pequenos aumentavam conforme o aumento da concentração do fármaco. (C, D) Resultados similares foram observados para as células silenciadas para o gene *FGD4* quando tratadas por 24 e 48 horas de paclitaxel, porém o efeito parece ser mais acentuado no grupo silenciado do que no grupo *scramble*.



**FIGURA 10: CÉLULAS SCRAMBLE E SILENCIADAS TRATADAS POR 24 HORAS COM PACLITAXEL:** As células *scramble* apresentaram um leve aumento da expressão de βIII-tubulina nas concentrações de 1 e 5 mM e um nítido aumento de GAP43 na concentração de 1 mM, seguida de uma diminuição da sua expressão na concentração de 5 mM de paclitaxel. Já as células silenciadas para o gene *FGD4* sem tratamento apresentaram uma redução na expressão de βIII-tubulina em relação às células *scramble* sem tratamento. E esta redução foi proporcional ao aumento da concentração de paclitaxel. Enquanto que a expressão de GAP43 no grupo shFGD4 sem tratamento também diminuiu em relação ao grupo *scramble* sem tratamento, porém essa redução se manteve ao longo das 3 concentrações de paclitaxel trabalhadas.