

Análise do papel da Quinase de Adesão Focal (FAK) e das miosinas Vb e Vc durante a resposta ao estresse genotóxico em miócitos cardíacos

Palavras-Chave: Quinase de Adesão Focal, miosina V, estresse genotóxico.

AGUIAR, C. S.; ANDRADE, M.; MORETTO, I; RODRIGUES, B. R.; SANTOS, A. M.; THOMAZ, A. A.

¹IB-UNICAMP, Departamento de Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP
²IFGW-UNICAMP, Instituto de Física de Gleb Wataghin, Departamento de Eletrônica Quântica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP
³INFABIC-UNICAMP, Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP

1 Introdução

A quimioterapia é um dos principais tratamentos utilizados para combater o câncer. Contudo, este tratamento oncológico pode levar a complicações cardiovasculares devido a ação de quimioterápicos, como a doxorrubicina, podendo causar insuficiência cardíaca e levar à morte do paciente [1]. Recentemente, alguns estudos vêm demonstrando a importância da Quinase de Adesão Focal (FAK) para a sobrevivência e resistência celular neste tipo de tratamento. A FAK é uma tirosina-quinase do tipo não receptor, que atua na regulação de diversos processos, como migração celular e na transdução de forças mecânicas em eventos bioquímicos celulares, que são fundamentais para a manutenção da homeostase celular e também na patogênese de doenças como câncer e doenças cardiovasculares [2]. Em miócitos cardíacos, essa quinase se localiza nos costâmeros, regiões análogas aos sítios de adesão focal, e nos sarcômeros, onde se co-localiza com a miosina sarcomérica [3]. Após diferentes estímulos, como o estresse oxidativo e mecânico, a FAK é rapidamente ativada e se redistribui pelo citoplasma e núcleo, promovendo a ativação de diferentes vias de sinalização que resultam na sobrevivência dos miócitos [4]. Além disso, alguns resultados demonstraram que a FAK interage fisicamente com a miosina Va e que essas proteínas estão co-localizadas nas adesões focais e no núcleo, sugerindo que a família de miosinas V seja importante para a distribuição subcelular da FAK e para sua localização no núcleo e nas adesões focais [5, 6]. No entanto, pouco se compreende sobre como ocorre a sinalização neste processo.

Tendo em vista a importância da FAK na regulação de processos de reparo ao dano no DNA, este trabalho tem como objetivo avaliar se o estresse causado pelo tratamento com doxorrubicina (doxo) modula a distribuição de FAK e das miosinas Vb e Vc em células de miócitos cardíacos. Além de verificar alterações celulares que o estresse genotóxico pode causar e o papel das miosinas nessa alteração.

1.1 Metodologia

Com a finalidade de avaliar a interação entre FAK e as miosinas Vb e Vc, células de miócitos cardíacos - H9C2 foram cultivadas e imunomarcadas para FAK, miosinas Vb e Vc, DNA e γ H2AX. Em parte das células foi realizado um estresse genotóxico causado por um tratamento com doxo por 12 horas. Assim, as células foram divididas em dois grupos: células controle e células tratadas com doxo, a fim de verificar a distribuição celular da FAK e das miosinas Vb e Vc antes e após o estresse genotóxico. Posteriormente, foram adquiridas as imagens por microscopia de super-resolução por iluminação estruturada (SR-SIM). A aquisição, reconstrução e alinhamento das imagens foram realizadas no microscópio Zeiss Elyra P1 com o software Zeiss ZEN 2012 SP1 (black edition, version 8.1.5.484) instalado no INFABIC (Unicamp). As imagens obtidas foram analisadas através do software ImageJ (Fiji) e scripts em Python. Foram analisadas 24 células controle e 31 células tratadas com doxo para células marcadas com a miosina Vb, e 25 células controle e 33 tratadas com doxo para as células marcadas com a miosina Vc. A análise das imagens foi feita através dos valores de intensidade integrada de fluorescência de FAK e das miosinas Vb e Vc encontradas no núcleo. Além disso, a normalidade da distribuição dos dados foi testada pelo Shapiro-Wilk test, em que valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Por fim, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre os diferentes canais para determinar a co-localização entre os canais nos clusters de FAK que foram observados na realização do experimento.

1.2 Resultados e Discussão

Observa-se nas figuras 1 e 2 as imagens do tipo SIM obtidas com marcação de FAK (verde), miosina V (vermelho), γ H2AX (cinza) e DNA (azul). Além disso, também é apresentado uma ampliação das adesões focais (quadrados brancos). A figura 1 mostra a localização de γ H2AX, miosina Vb, FAK e a sobreposição das imagens em uma célula do grupo controle e outra do grupo tratada com doxo. Pode-se observar o aumento da quantidade de γ H2AX após o tratamento com doxo, como previsto, visto que esta proteína está relacionada a presença de danos no DNA. Também é possível visualizar a distribuição da FAK e da Miosina Vb pelo citoplasma e pelo núcleo, e o efeito do tratamento com doxo na morfologia celular que resultou em uma redistribuição nuclear da FAK e da Miosina Vb. Analisando as imagens, percebe-se uma intensa localização nuclear e citoplasmática de FAK no grupo controle e uma diminuição dessa intensidade no grupo tratado com doxo, enquanto houve um aumento da localização de miosina Vb, tanto no núcleo quanto no citoplasma, após o estresse genotóxico.

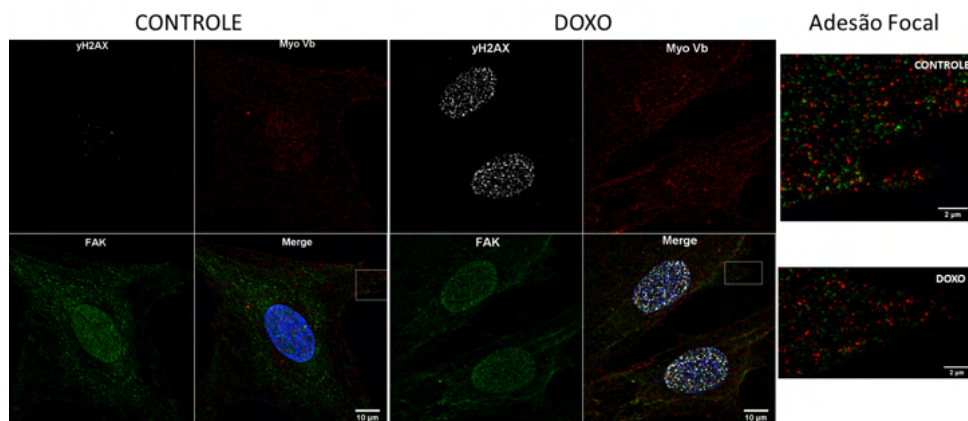


Figura 1: Imagens representativas de microscopia de Super-Resolução do tipo Iluminação Estruturada (SR-SIM), na qual cardiomiócitos controle e tratados com doxo foram fixados e processados para imunofluorescência utilizando-se anticorpos contra γ H2AX (cinza), Miosina Vb (vermelho), FAK (verde) e DNA (azul). Na imagem também é mostrada a sobreposição dos sinais de fluorescência (Merge) e as regiões de adesões focais ampliadas.

Na figura 2, temos a imagem de microscopia SIM para células marcadas com a Miosina Vc. É possível observar o mesmo comportamento descrito anteriormente para miosina Vb, onde tem-se um aumento da localização nuclear e citoplasmática da miosina Vc em células tratadas com doxo, enquanto há uma diminuição de FAK; além do aumento do número de γ H2AX devido aos danos no DNA resultantes do tratamento com o quimioterápico. Também é possível verificar que o aumento da concentração de miosina Vc após esse tratamento é mais expressivo no núcleo. Esses resultados obtidos sugerem que o estresse genotóxico pode promover uma atuação conjunta de FAK e das miosinas Vb e Vc na resposta ao dano no DNA.

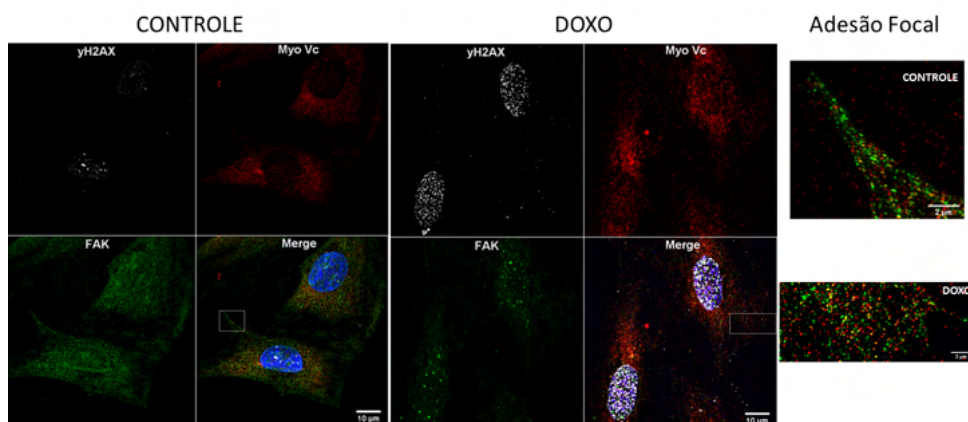


Figura 2: Imagens representativas de microscopia de Super-Resolução do tipo Iluminação Estruturada (SR-SIM), na qual cardiomiócitos controle e tratados com doxo foram fixados e processados para imunofluorescência utilizando-se anticorpos contra γ H2AX (cinza), Miosina Vc (vermelho), FAK (verde) e DNA (azul). Na imagem também é mostrada a sobreposição dos sinais de fluorescência (Merge) e as regiões de adesões focais ampliadas.

Na Figura 3 é possível observar as imagens ampliadas na região delimitada pelo núcleo (traçada em branco) e a análise quantitativa do número de γ H2AX (cinza) e da intensidade dos sinais de fluorescência de miosina V e FAK, na região delimitada pelo núcleo de uma célula tratada com doxo e outra do grupo controle marcada para miosina Vb e Vc, respectivamente. Analisando os gráficos e as imagens, pode-se constatar o aumento da quantidade de γ H2AX e da intensidade de miosina Vb e Vc no núcleo da célula após o tratamento com doxo, enquanto tem-se uma pequena diminuição da intensidade de FAK. Observa-se também que o estresse genotóxico promoveu uma redistribuição de FAK, em que esta proteína passou a agrupar-se em pontos (clusters) distribuídos ao longo do núcleo.

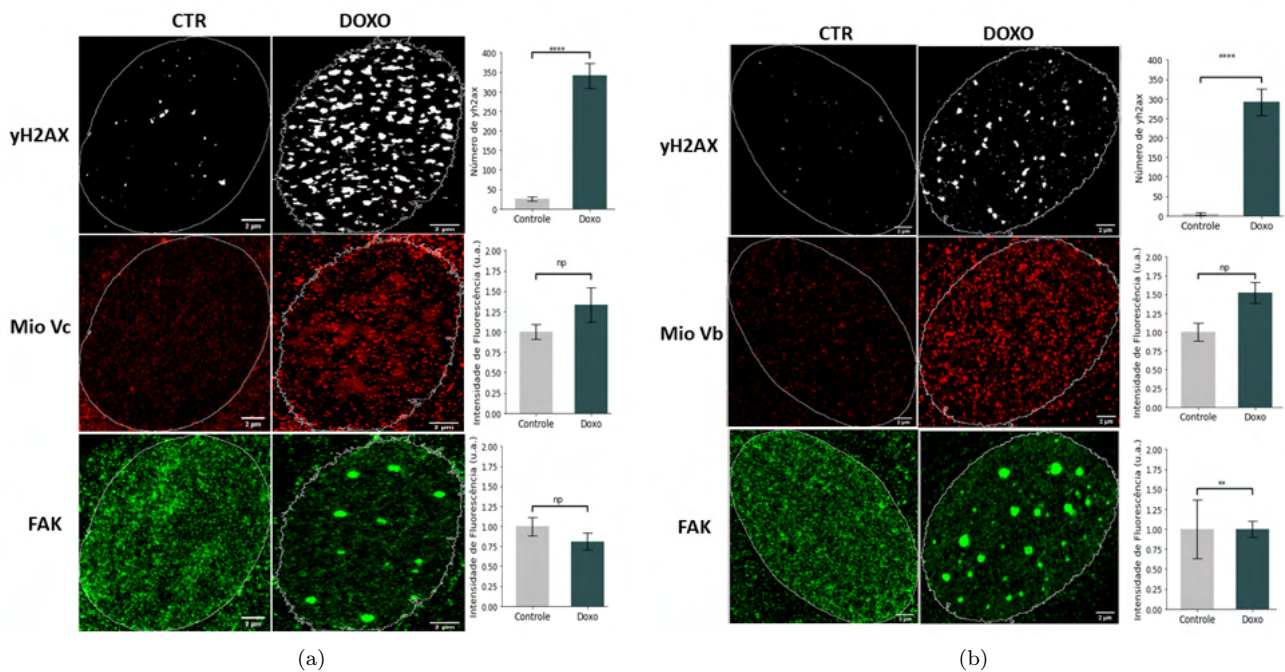


Figura 3: Imagens ampliadas obtidas através de microscopia SR-SIM, em que é possível observar a intensidade de sinais de fluorescência de γ H2AX (cinza), miosina Vb e Vc (vermelho) e FAK (verde) na região delimitada pelo núcleo (traçado em branco) de uma célula controle e tratada com doxo. Ao lado, gráficos em barras demonstram a quantificação do número de γ H2AX e da intensidade média de fluorescência de FAK e Miosina em células controle (CTR) e tratadas com doxo.

O gráfico 4 mostra o número de sítios de γ H2AX em células tratadas com doxo em que verificou-se a presença de clusters de FAK e células sem clusters de FAK. O resultado obtido indica que a presença dos clusters pode estar relacionada com a extensão dos danos no DNA, uma vez que há um aumento no número de células com clusters quando há maior número de γ H2AX. Nota-se também, analisando a sobreposição dos sinais de fluorescência, uma possível co-localização desses clusters com os sítios de γ H2AX.

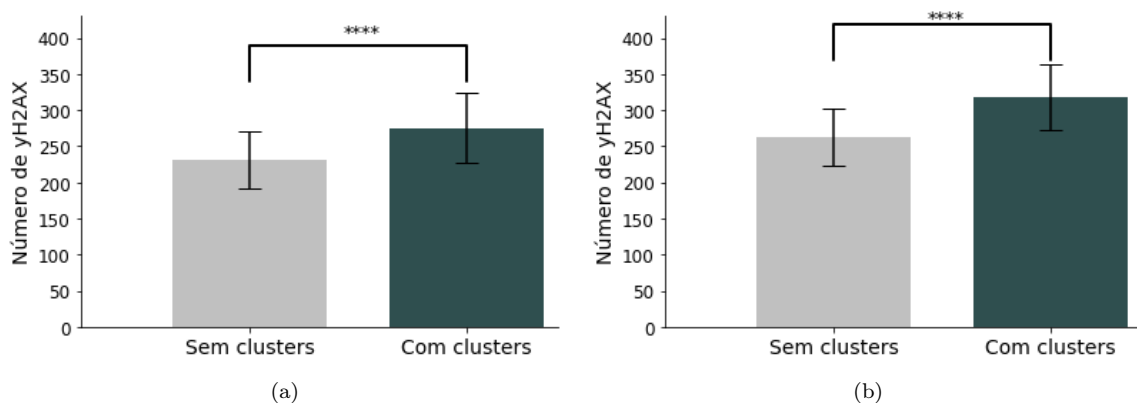


Figura 4: Número de γ H2AX em células marcadas com a Miosina Vb e Vc, respectivamente, em que não observou-se a presença de clusters de FAK e em células com a presença de clusters.

Para verificar a co-localização dos clusters de FAK nucleares com os pontos de γ H2AX, delimitou-se um círculo em volta de cada cluster, com raio duas vezes maior que o raio da área do cluster, como mostrado na figura 5. Foram analisados 165 clusters de FAK em células marcadas com miosina Vc e 163 clusters em células marcadas com miosina Vb.

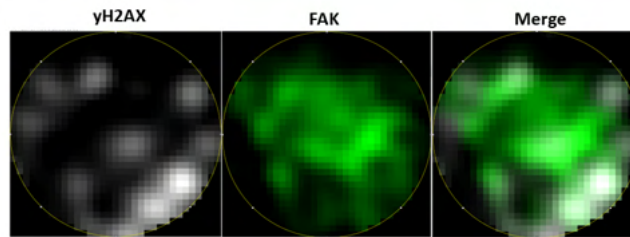


Figura 5: Ampliação do cluster de FAK delimitado por um círculo com raio duas vezes maior que o raio da área do cluster. Da esquerda para direita é possível visualizar o canal de H2AX (cinza), FAK (verde) e sobreposição de ambos os canais (merge), delimitados pelo círculo em amarelo.

Após a delimitação das regiões dos clusters nas células, calculou-se o Coeficiente de Correlação de Pearson, pixel a pixel, entre os canais de FAK e γ H2AX, FAK e Miosina e γ H2AX e Miosina em cada região. Os resultados obtidos são demonstrados nos histogramas da figura 6. Analisando os histogramas, observa-se que os canais de γ H2AX e Miosina, e Miosina e FAK, possuem uma correlação, predominantemente, positiva com pico entre 0 e 0.2. Enquanto a correlação entre os clusters de FAK e os sítios de γ H2AX possui valores mais dispersos, com baixos picos em 0 e entre 0.3 e 0.8 para células marcadas com miosina Vb, e pico em 0.2 para células marcadas com miosina Vc.

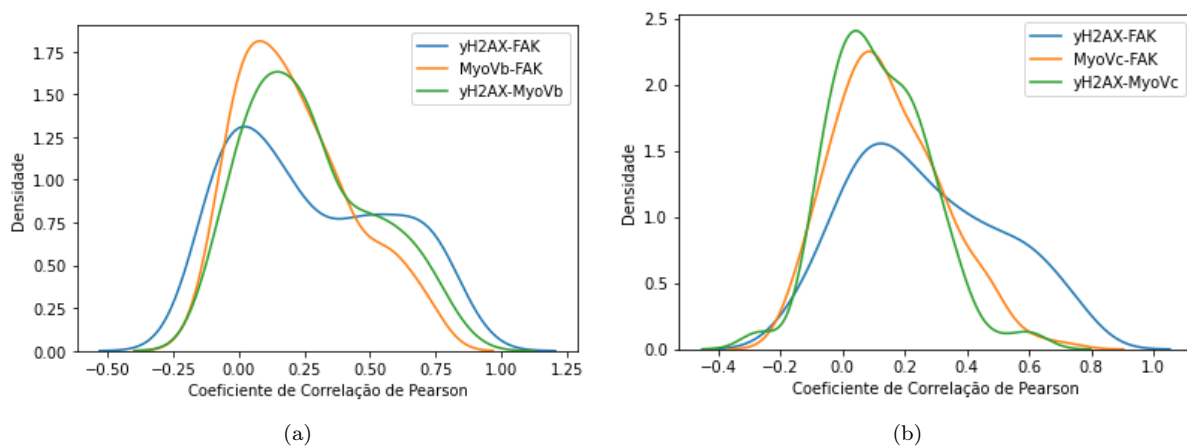


Figura 6: Histogramas dos coeficientes de correlação pixel a pixel entre os canais de FAK e γ H2AX, FAK e Miosina e γ H2AX e Miosina nos cluster de FAK em células marcadas com miosina Vb e Vc, respectivamente.

Além disso, foi feita uma outra análise, em que realizou-se a soma dos pixels de cada canal delimitado pela região do cluster e calculou-se o coeficiente de Pearson entre os canais de cada célula. A figura 7 mostra o coeficiente de correlação entre os canais, onde cada ponto corresponde a uma célula. Os dados obtidos mostram uma alta co-localização entre os canais de FAK e miosina nas regiões dos clusters, em que obteve-se o coeficiente de correlação acima de 0.25 para células marcadas com miosina Vb e acima de 0.5 para células marcadas com miosina Vc. Entre os canais de γ H2AX e FAK, tem-se uma taxa de correlação positiva (entre 0-1) para a maioria das células, e uma correlação negativa para uma única célula. Também é possível observar uma maior dispersão dos valores do coeficiente de correlação entre os canais de γ H2AX e FAK, como foi observado nos histogramas, o que indica uma variação da co-localização entre os sítios γ H2AX e os clusters de FAK para cada célula analisada. O mesmo comportamento foi observado entre os canais γ H2AX e Miosina, em que obteve-se valores mais dispersos e uma taxa de correlação positiva, com uma única célula com correlação abaixo de zero. Portanto, além dos sítios de γ H2AX, possivelmente, estarem relacionados ao aparecimento dos clusters de FAK, os dados mostram que eles também estão co-localizados. Para melhor avaliação desta co-localização, é necessária uma análise com um maior número de células e a avaliação da correlação entre os canais de áreas aleatórias nos núcleos.

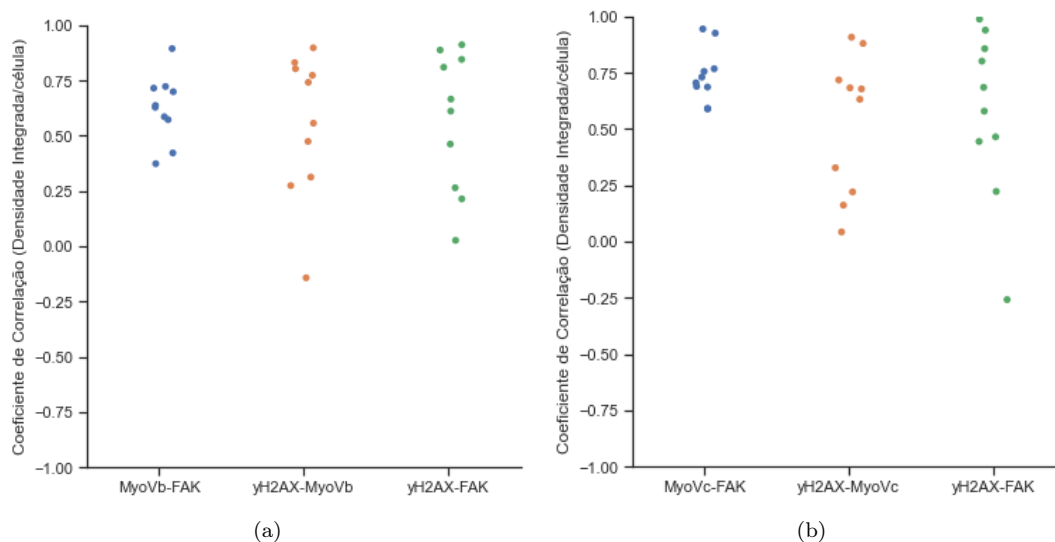


Figura 7: Gráfico dos coeficientes de correlação por célula entre os canais de FAK e γ H2AX, FAK e Miosina V e γ H2AX e Miosina nos cluster de FAK em células marcadas com miosina Vb e Vc, respectivamente.

2 Conclusão

Com os resultados obtidos, através das imagens de microscopia SIM, constatou-se um aumento da concentração de miosina Vb e Vc no núcleo das células após o tratamento com doxo. Esses resultados sugerem que o estresse genotóxico pode promover uma atuação conjunta de FAK e das miosina Vb e Vc na resposta ao dano no DNA. Além disso, observou-se a presença de clusters de FAK no núcleo das células que, possivelmente, está relacionada com a extensão dos danos no DNA, uma vez que há um aumento no número de células com clusters quando há maior número de sítios de γ H2AX. Por fim, observou-se uma co-localização entre os clusters e o sítios de γ H2AX, necessitando de uma análise com um maior número de células e de áreas aleatórias nos núcleos.

Referências

- [1] S. Fazio, E. A. Palmieri, B. Ferravante, F. Bonè, B. Biondi, and L. Saccà, "Doxorubicin-induced cardiomyopathy treated with carvedilol,"(in eng), Clin Cardiol, vol. 21, no. 10, pp. 777-9, Oct 1998.
- [2] A. C. Cardoso et al., "FAK Forms a Complex with MEF2 to Couple Biomechanical Signaling to Transcription in Cardiomyocytes,"(in eng), Structure, vol. 24, no. 8, pp. 1301-10, Aug 2016, doi: 10.1016/j.str.2016.06.003
- [3] A. M. Santos et al., "FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy,"Nat Chem Biol, vol. 8, pp. 102-110, 2012.
- [4] L. RE, "Myosin-V: A Class of Unconventional Molecular Motors,"Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas, vol. 29, no. 3, 1996 Mar 1996.
- [5] B. C. Knowles et al., "Myosin Vb uncoupling from RAB8A and RAB11A elicits microvillus inclusion disease,"in J Clin Invest, vol. 124, no. 7), 2014, pp. 2947-62.
- [6] O. C. Rodriguez and R. E. Cheney, "Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells,"(in en), 2002-03-01 2002.