

FUNDAÇÃO DE ENSINO DE CONTAGEM - UNIDADE CENTEC

DEISIELLY DINIZ COSTA DE JESUS

JÚLIA GALDINO LINHARES

RAPHAEL VIEIRA RIBEIRO

**ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS
A CANAIS IÔNICOS EM LINHAGENS CELULARES NORMAIS E
TUMORAIS DE OVÁRIO POR SDS-PAGE**

CONTAGEM, MG

2025



DEISIELLY DINIZ COSTA DE JESUS

JÚLIA GALDINO LINHARES

RAPHAEL VIEIRA RIBEIRO

**ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS
A CANAIS IÔNICOS EM LINHAGENS CELULARES NORMAIS E
TUMORAIS DE OVÁRIO POR SDS-PAGE**

Relatório apresentado à 9ª FEMIC - Feira
Mineira de Iniciação Científica.

Orientação da Prof.^a Bruna de Lima Alves e
coorientação de Luciana Godoy Pellucci de
Souza.

CONTAGEM, MG

2025



RESUMO

O câncer de ovário é uma das neoplasias ginecológicas mais agressivas e letais, caracterizado por seu comportamento metastático e pela alta taxa de mortalidade entre mulheres em todo o mundo. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2023, mais de 4.000 óbitos por câncer foram registrados entre mulheres no Brasil. Pesquisas indicam que os canais iônicos, especialmente os canais de potássio (K^+), exercem papel relevante na progressão tumoral, influenciando processos como proliferação celular, migração e apoptose. Com base nisso, este projeto teve como objetivo investigar a expressão diferencial de proteínas associadas a canais de K^+ em células normais (CHO) e tumorais (OV-90) de ovário. As linhagens foram cultivadas em condições adequadas e submetidas à extração, quantificação proteica e análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas foram desnaturadas, separadas conforme o peso molecular e coradas com azul de Coomassie, permitindo a comparação dos perfis proteicos entre as amostras. A análise revelou diferenças marcantes entre as linhagens, especialmente na faixa de 50 a 75 kDa. As amostras OV-90 apresentaram bandas mais intensas nessa região em todas as concentrações (5, 10, 15 e 20 μ g), destacando-se uma banda em torno de 60 kDa, sugerindo maior expressão dessas proteínas nas células tumorais. Embora os resultados indiquem variação possivelmente relacionada aos canais de K^+ , a confirmação requer métodos complementares, já que a SDS-PAGE não permite identificação específica. Também foram observadas outras bandas em diferentes faixas de peso molecular, que podem representar proteínas envolvidas em processos celulares relevantes. Os achados contribuem para compreender o papel dos canais de K^+ no câncer de ovário e fornecem base para futuras investigações sobre seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: canais de potássio; câncer de ovário; eletroforese.



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 JUSTIFICATIVA	6
3 OBJETIVOS	7
3.1. Objetivo Geral	7
3.2. Objetivos Específicos	7
4 METODOLOGIA	8
4.1. Materiais	8
4.2. Métodos	8
5 RESULTADOS OBTIDOS	12
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
REFERÊNCIAS	15
ANEXO 1- Prrotocolo Eletroforese.....	16



1 INTRODUÇÃO

O câncer ginecológico caracteriza-se pelo crescimento descontrolado e disseminação de células malignas do trato genital feminino, sendo uma das principais causas de mortalidade feminina, embora subexplorado em pesquisas. Entre essas neoplasias, o câncer de ovário se destaca por sua alta letalidade, agressividade e potencial metastático (Lheureux, Stephanie et al., 2019). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2024), estimou mais de 7.300 novos casos e aproximadamente 4.400 óbitos em 2023, com diagnóstico frequente tardio devido à ausência de sintomas específicos e à limitação de métodos de triagem, resultando em baixas taxas de sobrevida (Serrano-Novillo, Clara et al., 2019).

Os canais iônicos são proteínas de membrana que regulam a entrada e saída dos íons na célula. Estudos recentes os indicam como alvos terapêuticos promissores em câncer de ovário, dada a sua influência em processos celulares como metástase e resistência a tratamentos (Cahill et al., 2020; Romito, Oliver et al., 2024). Esses canais de membrana regulam excitabilidade, contração, metabolismo, ciclo celular, proliferação e apoptose, e suas alterações em canais dependentes de voltagem estão associadas a diversas patologias, incluindo neoplasias (Zhou, Yubin et al., 2024).

Canais de potássio dependentes de voltagem (Kv), clássicos na transmissão neuronal e contração muscular, participam de proliferação e migração celular, e sua expressão alterada em múltiplos tipos tumorais sugere relevância na biologia do câncer (Pardo, Luis et al., 2014; Arcangeli, Annarosa et al., 2023). Contudo, a expressão desses canais em células de câncer de ovário, especialmente em estágios avançados, permanece pouco elucidada, justificando a investigação das propriedades eletroforéticas de Kv na linhagem OV-90.

Dessa forma, o presente trabalho propõe a análise comparativa do perfil proteico entre linhagens celulares normais (CHO) e tumorais de ovário (OV-90), com foco na identificação de diferenças de expressão relacionadas aos canais de potássio dependentes de voltagem (Kv). A partir da aplicação da técnica de eletroforese SDS-PAGE, busca-se observar possíveis variações no padrão e na intensidade das bandas proteicas entre os grupos, fornecendo indícios sobre a presença dessas proteínas em células neoplásicas.



2 JUSTIFICATIVA

O câncer ginecológico representa um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, sendo responsável por uma expressiva parcela da mortalidade entre mulheres. Dentre as neoplasias que acometem o trato reprodutivo feminino, o câncer de ovário se destaca por apresentar uma das maiores taxas de letalidade. Essa elevada mortalidade está associada a características biológicas específicas, como sua alta agressividade, potencial metastático e, sobretudo, a dificuldade em estabelecer um diagnóstico precoce.

O caráter insidioso do câncer de ovário está relacionado ao fato de que seus sintomas iniciais são inespecíficos, podendo ser confundidos com condições benignas do trato gastrointestinal ou reprodutivo. Consequentemente, a detecção da doença ocorre, na maioria das vezes, em estágios avançados, quando as opções terapêuticas são mais limitadas e a taxa de sobrevida é reduzida. Esse cenário evidencia a necessidade urgente de aprimorar as estratégias de diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Apesar dos avanços nas terapias antitumorais, o câncer de ovário ainda carece de métodos de rastreamento e biomarcadores eficazes que permitam um diagnóstico precoce. Nesse cenário, estudos que avaliam a expressão de proteínas envolvidas no comportamento tumoral tornam-se relevantes. Entre essas proteínas, os canais iônicos vêm sendo analisados por estarem associados a processos como proliferação, migração celular e resistência a fármacos, aspectos que podem contribuir para a maior agressividade observada nessa neoplasia.

No entanto, ainda são escassos os estudos que exploram os mecanismos de funcionamento desses canais em células de câncer de ovário, especialmente nos casos mais agressivos e metastáticos. Essa lacuna de conhecimento limita a compreensão dos processos que sustentam a progressão da doença e impede o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas direcionadas. Assim, investigar o papel dos canais iônicos no câncer de ovário é de extrema relevância, pois pode contribuir para a identificação de novos alvos moleculares, aprimorar o entendimento da biologia tumoral e, futuramente, auxiliar na criação de estratégias mais eficazes de prevenção e tratamento.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a expressão diferencial de proteínas associadas a canais iônicos de potássio em duas diferentes condições celulares, células normais e células tumorais de ovário, por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), com o intuito de analisar alterações nos perfis proteicos e compreender o papel funcional desses canais na biologia tumoral. O projeto busca elucidar como as atividades dos canais de potássio pode influenciar processos fundamentais como a proliferação, migração, invasão e resistência ao tratamento nas células tumorais de ovário. O estudo propõe analisar e comparar as bandas proteicas obtidas, buscando observar alterações no padrão de expressão entre as amostras celulares. A partir desses resultados, pretende-se levantar hipóteses sobre a participação de proteínas relacionadas aos canais de potássio no câncer de ovário, contribuindo para o entendimento de suas possíveis implicações na biologia tumoral e fornecendo subsídios para pesquisas posteriores voltadas à identificação de novos biomarcadores e potenciais alvos terapêuticos.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar as duas linhagens celulares (CHO e OV-90) em condições controladas;
- Extrair e quantificar as proteínas totais de cada linhagem;
- Separar as proteínas por SDS-PAGE e analisar diferenças nos perfis de bandas;
- Associar evidências da presença ou alteração na expressão de canais iônicos.



4 METODOLOGIA

4.1. Materiais

- Acrilamida;
- Água destilada;
- Água Mili-Q;
- Álcool 70%;
- Azul de Coomassie;
- Cuba;
- Estufa;
- Fonte de alimentação elétrica;
- Gel de poliacrilamida 10%;
- Linhagens celulares (OV-90 e CHO);
- Pente;
- Persulfato de amônio 10%;
- Pipetas automáticas;
- Ponteiras;
- Solução tampão (PBS);
- TEMED;
- Tris-glicina (tampão);
- Tris HCl 0.5 M;
- Tris HCl 1.5 M;
- Vidro 1 mm.

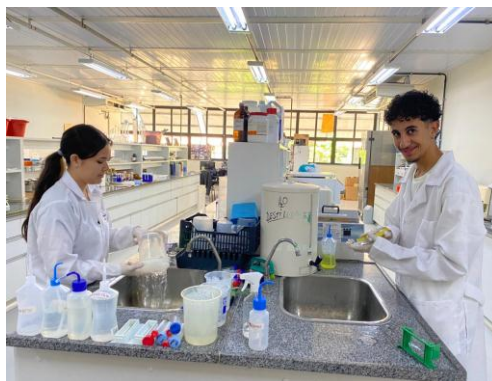
4.2. Métodos

Primeiramente foi realizada a cultura celular. A linhagem celular de câncer de ovário, OV-90 (ATCC, CRL-3585™), foi gentilmente cedida pela professora Dra. Luciana Maria Silva (Laboratório de Cultivo Celular, Fundação Ezequiel Dias – FUNED). As células foram cultivadas a uma mistura de 1:1 de meio MCDB 105 contendo uma concentração final de 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e Meio 199 contendo uma concentração final de 2,2g/L de



bicarbonato de sódio, suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), com 1% de penicilina-estrepomicina, sendo mantidas em estufa a 37° C, com atmosfera úmida a 5% de CO₂. Depois foi realizada a extração e quantificação das proteínas, onde as células foram lavadas com solução tampão (PBS) e lisadas com RIPA buffer contendo inibidores de protease.

Figura 1: Higienização dos materiais que seriam utilizados na eletroforese



Fonte: autoral

Após centrifugação, o sobrenadante contendo proteínas foi coletado. A concentração foi determinada pelo método de Lowry. Após essa preparação, foi realizada a técnica da eletroforese (Anexo 1) de proteínas que é uma técnica laboratorial amplamente utilizada para separar proteínas com base no tamanho e peso molecular. Para otimizar a separação, utilizou-se um gel de concentração, que concentra as proteínas em uma camada fina antes da migração, garantindo bandas mais nítidas, seguido de um gel de separação, que permite diferenciar as proteínas de acordo com seu tamanho molecular. Essa estrutura funciona como uma “peneira molecular”, dificultando a passagem das proteínas maiores e permitindo maior mobilidade às menores.



Figura 2: Preparo do gel de poliacrilamida

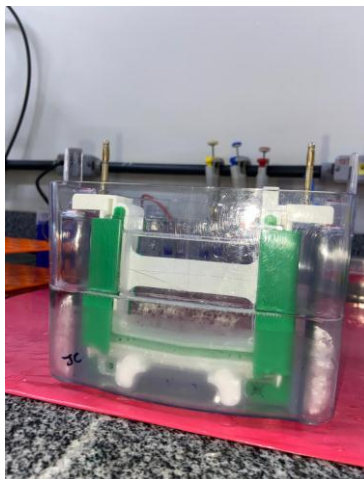


Fonte: autoral

Em seu estado nativo, as proteínas apresentam cargas elétricas variadas, o que influencia sua migração em direção ao ponto isoelétrico. No entanto, para tornar a separação mais eficiente e padronizada, as proteínas geralmente são desnaturadas com o uso de SDS (dodecil sulfato de sódio), um detergente aniônico que reveste as proteínas e confere a elas uma carga negativa uniforme, independentemente de sua carga original ou estrutura tridimensional. Dessa forma, ao serem submetidas a um campo elétrico, migram em direção ao polo positivo, sendo separadas principalmente de acordo com seu peso molecular. Essa abordagem, conhecida como SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis), é uma ferramenta fundamental na análise proteica, permitindo a caracterização de perfis de expressão, pureza e alterações estruturais em diversas condições experimentais. Vale ressaltar que no preparo do gel a concentração e a espessura do gel são de extrema importância, uma vez que, se tem uma concentração mais ideal para visualização da proteína de interesse.



Figura 3: Corrida do gel de poliacrilamida



Fonte: autoral

Por fim, o gel será corado com azul de Coomassie, permitindo a visualização das bandas proteicas resultantes. Os perfis proteicos das linhagens celulares serão analisados comparativamente com base na intensidade, no número e no padrão das bandas observadas. Diferenças entre os grupos poderão indicar alterações na expressão proteica, com atenção especial para bandas localizadas na faixa de peso molecular estimada para canais iônicos de potássio, entre 40 e 100 kDa.

Figura 4: Descoloração do gel para visualização das bandas



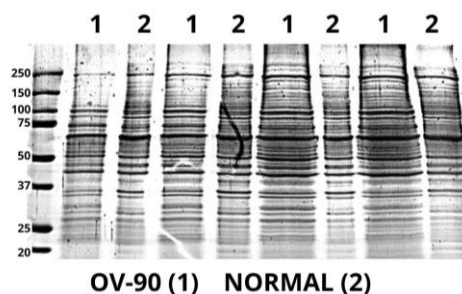
Fonte: autoral.



5 RESULTADOS OBTIDOS

A análise das amostras por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), permitiu observar diferenças no perfil proteico entre as linhagens celulares normal (CHO) e tumoral (OV-90). Considerando que as proteínas associadas aos canais de K^+ dependentes de voltagem são o alvo do nosso estudo e que tais proteínas apresentam peso molecular entre 50 e 75 kDa, as bandas correspondentes a essa faixa foram analisadas com maior atenção.

Figura: Resultado da eletroforese.



Fonte: autoral.

Ao comparar os perfis das linhagens celulares dentro dessa faixa, observamos que OV-90 apresentam bandas maiores e mais escuras entre 50 e 75 kDa em todas as concentrações analisadas (5, 10, 15 e 20 μ g), em comparação com o perfil das amostras controle. É possível visualizar uma pequena diferença no perfil de banda nas concentrações iniciais, tornando mais evidente com o aumento das concentrações, indicando uma expressão diferencial dessas proteínas na célula tumoral em relação à célula controle.

Nas maiores concentrações (15 e 20 μ g), as bandas em torno de 60 kDa se destacam especialmente na linhagem OV-90, sugerindo uma maior expressão de proteínas possivelmente associadas aos canais de potássio dependentes de voltagem. Em contraste, nas amostras controle, a mesma região apresenta bandas menos intensas, mesmo em concentrações maiores. Essa diferença de intensidade sugere uma variação na expressão dessas proteínas associadas aos canais de K^+ dependentes de voltagem entre as duas linhagens.



No entanto, essa associação ainda não pode ser confirmada apenas pela SDS-PAGE, uma vez que a técnica realiza a separação das proteínas com base exclusivamente em seu tamanho molecular, sem permitir a identificação específica de cada uma delas. Assim, embora a diferença na intensidade das bandas possa indicar uma variação na expressão de proteínas associadas aos canais de K^+ dependentes de voltagem, a confirmação dessa hipótese requer a aplicação de métodos complementares de maior especificidade. A utilização de abordagens adicionais permitiria verificar se as bandas observadas correspondem, de fato, a proteínas relacionadas aos canais de potássio e, consequentemente, esclarecer seu possível envolvimento nos mecanismos celulares associados ao câncer.

Além disso, também foi possível visualizar outras bandas em diferentes intervalos de peso molecular ao longo da eletroforese. Essas bandas, embora não estejam diretamente relacionadas ao alvo principal do estudo, podem representar outras proteínas envolvidas em processos celulares importantes que contribuem para o comportamento das linhagens analisadas. Embora o foco deste trabalho esteja nas proteínas associadas aos canais de potássio, os demais padrões de expressão observados também revelam resultados relevantes, que não podem ser descartados e que podem apontar para outros mecanismos envolvidos na biologia tumoral.

Vale ressaltar que durante a execução da metodologia, algumas dificuldades foram enfrentadas, resultando em tentativas não bem-sucedidas. Entre os principais desafios, destacaram-se erros de pipetagem e a quebra do gel, especialmente devido à sua espessura reduzida de 1 mm, que o torna mais frágil e suscetível a danos durante o manuseio. Outro fator que comprometeu o processo foi a polimerização extremamente rápida do gel. Após a adição dos dois últimos reagentes (persulfato de amônio e TEMED), a reação de polimerização se inicia quase imediatamente. Essa rápida solidificação exige agilidade na transferência da solução para o interior das placas de vidro. Quando esse passo não é realizado com a devida rapidez e precisão, o gel pode começar a solidificar fora das placas, tornando impossível sua adequada inserção e, consequentemente, inviabilizando sua utilização na eletroforese. Essas dificuldades reforçam a importância da padronização e da prática prévia da técnica, além de um planejamento rigoroso de cada etapa, para garantir a reprodutibilidade e o sucesso experimental.



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu analisar de forma comparativa o perfil proteico de células normais (CHO) e tumores de ovário (OV-90) por meio da técnica de SDS-PAGE, com foco na faixa de peso molecular correspondente aos canais iônicos dependentes de voltagem (50–75 kDa). Os resultados obtidos demonstraram diferenças claras na intensidade e padrão das bandas entre as duas linhagens, indicando uma maior expressão de proteínas nessa faixa em células tumorais em comparação com células normais. Esse achado sugere que a expressão de proteínas potencialmente associadas a canais de potássio pode estar aumentada em células de câncer de ovário, corroborando a literatura que associa canais iônicos à agressividade e à progressão tumoral. Apesar das dificuldades técnicas enfrentadas, como quebra do gel e rápida polimerização, as soluções aplicadas garantiram a obtenção de resultados consistentes. A técnica SDS-PAGE não permite a identificação direta das proteínas presentes, entretanto, os perfis observados fornecem indícios importantes para pesquisas futuras sobre a expressão de canais de potássio e sua relevância funcional em células neoplásicas.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCANGELI, A. et al. The role of potassium channels in tumours of the gastrointestinal tract: a focus on the human ether-à-go-go related gene 1 channels. *The Journal of Physiology*, v. 601, p. 1597-1610. 2023.
- ASHER, Viren; et al. The Eag potassium channel as a new prognostic marker in ovarian cancer. *Diagnostic Pathology*, v. 5, n. 1, p. 78, 2010.
- CAHILL, T. J. et al. Ion channels as therapeutic targets in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 77, p. 305-324. 2020.
- HAN, Xiaobing; et al. The potassium ion channel opener NS1619 inhibits proliferation and induces apoptosis in A2780 ovarian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 374, n. 3, p. 510 - 515, 2008.
- INNAMAA, A.; et al. Expression and effects of modulation of the K2P potassium channels TREK-1 (KCNK2) and TREK-2 (KCNK10) in the normal human ovary and epithelial ovarian cancer. *Clinical and Translational Oncology*, v. 15, n. 9, p. 780 - 788, 2013.
- LHEUREUX, S. et al. Epithelial ovarian câncer. *The Lancet*, v. 393, p.1240 - 1253. 2019.
- PARDO, L., STÜHMER, W. The roles of K⁺ channels in cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 14, p. 39-48. 2014.
- SERRANO-NOVILLO, C. et al. Implicação dos canais de potássio dependentes de voltagem na proliferação de células neoplásicas. *Cancers*, v. 11, n. 3, p. 287, 2019.
- ROMITO, O. et al. Plasma membrane SK2 channel activity regulates migration and chemosensitivity of high-grade serous ovarian cancer cells. *Molecular Oncology*, v.18, p.1853-1865. 2024.
- ZHOU, Y., et al. Ion channel signalling mechanisms in physiology and disease. *The Journal of Physiology*, v. 602, p. 3273-3274. 2024.



ANEXO 1 – Protocolo Eletroforese

- 1) Limpar, com o auxílio de uma gaze e álcool 70%, as placas de vidro para eletroforese.
- 2) Montar o sistema de eletroforese para preparação do gel de SDS.
- 3) Preparar o GEL DE SEPARAÇÃO e, com o auxílio de uma pipeta automática, transferir o mesmo para as placas de vidro.

Gel de separação (volume para 2 géis - 12 mL)

	5%	7.5%	10%	12%	X % (15mL)
Acrilamida 30%	2.0 mL	3.0 mL	4.0 mL	4.8 mL	0.5 x X mL
Tris HCl 1.5M	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL	3.0 mL	3.75 mL
SDS 10%	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	150 µl
Água Mili-Q	6.8 mL	5.8 mL	4.8 mL	4.0 mL	11.03 - (0,5 x X) mL
Persulfato de amônio 10%	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl

- 4) Caso seja necessário, aplicar um pouco de água onde houver a formação de bolhas.
- 5) Aguardar a polimerização do gel (de 15 a 25 minutos).
- 6) Com o auxílio de um papel filtro, remover o excesso de água.
- 7) Preparar o GEL DE CONCENTRAÇÃO e, com o auxílio de uma pipeta automática, transferir o mesmo para as placas de vidro.



Gel de concentração (volume para 4 géis - 10mL):

Reagentes	4%
Acrilamida 30%	1.33 mL
Tris HCl 0.5M	2.52 mL
SDS 10%	100 µl
Água Mili-Q	6.0 mL
Persulfato de amônio 10%	75 µl
TEMED	7.5 µl

8) Posicionar o pente de canaletas no vidro.

9) Aguardar a polimerização do gel (cerca de 20 minutos).

10) Remover os pentes e transferir as placas para a cuba de eletroforese.

11) Adicionar o TAMPÃO DE CORRIDA no interior da cuba de eletroforese, atingindo o volume indicado na mesma para 2 ou 4 géis.

Tampão de corrida:

100 mL Tris-Glicina 10X

10 mL SDS 10%

Volume final = 1L 890 mL Água

Mili-Q

12) Preparar as AMOSTRAS e TAMPÃO DE AMOSTRA.

OBS: O mercaptoetanol deve ser adicionado no momento do preparo das amostras; por esse motivo, adicionar 50 µL do mesmo para cada alíquota de 1 mL. A amostra é adicionada ao tampão de amostra na proporção 1:3 (50 µL tampão + 100 µL amostra).

Tampão de amostra:

500 µl Glicerol

2 mL SDS 10%

= 400 µl Azul de Bromofenol 2 %

2.5 mL Tris-HCl 0.5M

Volume final = 10 mL (ajustar pH
6,8; completar volume com água
mili-Q)



- 13) Deixar as amostras aquecendo em banho-maria à 50°C por 10 minutos.
- 14) Pipetar as amostras e o tampão de amostra dentro das respectivas canaletas (atenção ao volume máximo de cada canaleta).
- 15) Correr o gel em temperatura ambiente (120 min - 120V - 0,40 A).