

PES053 - PRINCIPAIS PROTEÍNAS DOS INVADOPÓDIOS SÃO EXPRESSAS EM LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE AMELOBLASTOMA

NATACHA MALU MIRANDA DA COSTA¹; STELIO DA SILVA MOREIRA FILHO²; CAROLINA CARMINE PROIETTI²; MARIA SUELI DA SILVA KATAOKA³; JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO³

natacha_malu@hotmail.com

¹Graduação, ²Ensino Médio Completo, ³Doutorado
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Introdução: Os tumores odontogênicos compreendem uma gama de desordens de crescimento, desde neoplasias benignas e malignas. Dentre estes tumores o ameloblastoma é o mais prevalente e embora seja um tumor benigno, apresenta comportamento localmente invasivo e recidivante, refletindo no seu alto índice de morbidade causada por seu comportamento biológico. Atualmente vários pesquisadores têm voltado sua atenção para entender quais moléculas estão envolvidas nas vias de sinalização que regulam o início e a progressão tumoral, a remodelação da matriz extracelular (MEC), das interações celulares e destas com a MEC. O processo invasivo das células neoplásicas consiste na disseminação das células tumorais para um sítio primário de desenvolvimento. Alguns mecanismos são necessários para que a célula neoplásica se desloque, caracterizando a invasão. Dentre eles podemos citar a formação dos invadopódios e sua ação proteolítica sobre a MEC. Invadopódios são protrusões de membrana celular ricas em microfilamentos de actina que se formam no ventre das células neoplásicas, estendendo-se verticalmente à MEC. Uma grande variedade de proteínas está associada à regulação dos invadopódios e progressão tumoral, dentre as moléculas associadas podemos destacar a cortactina, substrato de tirosina quinase-5 (TKs-5), substrato de tirosina quinase-4 (TKs-4) e a metaloproteinase transmembrana tipo 1 (MT1-MMP). Cortactina é, dentre outras proteínas, responsável pela regulação da polimerização da actina, participando da etapa de iniciação do invadopódio. Neste momento, há a interação entre receptores de membrana que enviam sinais do microambiente extracelular para a modificação estrutural do citoesqueleto. Estes sinais fazem com que substratos da família Src sejam ativados, dentre eles TKs-5 e TKs-4. Ambos são proteínas adaptadoras distribuídas pelo citoplasma em situação fisiológica, mas em condições patológicas situam-se próximos da membrana plasmática. A TKs-5 é expressa logo nos primeiros estágios de formação dos invadopódios, participando na alongação da estrutura e estando associada à cortactina. Já TKs-4 é responsável por regular a localização, a secreção e a estabilização da MT1-MMP, resultando na proteólise localizada da MEC e subsequente invasão tumoral. **Objetivos:** Verificar a expressão de cortactina, TKs-4, TKs-5 e MT1-MMP por imunofluorescência, Western-Blot e imunohistoquímica, além de detectar a presença dos invadopódios pelo método do ensaio de formação de invadopódios em substrato fluorescente no ameloblastoma para tentar esclarecer possíveis eventos celulares relacionados ao seu comportamento biológico. **Métodos:** Esta pesquisa foi realizada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências em Saúde da Universidade Federal do Pará. Para a realização dos experimentos in vitro, células da linhagem AME-hTERT derivadas de cultura primária de ameloblastoma sólido convencional (AME-1) foram utilizadas. As células, mantidas sob baixa temperatura (nitrogênio líquido), foram descongeladas e transferidas para frascos de cultivo celular contendo meio de cultura DMEM-F/12, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em incubadora com temperatura a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após

atingirem confluência de 70% a 80%, as células foram transferidas e cultivadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços e submetidas ao protocolo de imunofluorescência indireta simples e de dupla marcação para detectar a presença das proteínas relacionadas aos invadopódios. Utilizamos como anticorpos primários anti-cortactina (1:200), anti-TKs-5 (1:50), anti-TKs-4 (1:100) e anti-MT1-MMP (1:20). Para a detecção do anticorpo primário foi realizada a incubação do anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor® 488 e os núcleos foram marcados com Hoechst 33258. Por fim, as lamínulas foram lavadas em solução tampão e em água destilada e montadas com Prolong Gold e posteriormente analisadas em microscópio de fluorescência, equipado com câmara fotográfica digital (AxiocamMRc). Adicionalmente, verificamos a expressão dessas proteínas utilizando Western-Blot, onde células da linhagem AME-hTERT foram cultivadas em placa de 6 poços e subsequentemente lisadas em tampão RIPA contendo inibidores de protease. Após dissociação enzimática, as proteínas celulares foram quantificadas pelo método do Ácido Bicinconínico (BCA), ressuspensas em tampão de amostras e carregadas em gel de poliacrilamida a 10% em uma cuba de eletroforese. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, permitindo a incubação dos anticorpos primários sobre esta membrana. Esses anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Protocolo de quimioluminescência (ECL kit,) foi utilizado para revelar a reação em filmes radiográficos. Também utilizamos a imunohistoquímica para detectarmos a colocalização das proteínas cortactina, TKs-4, TKs-5 e MT1-MMP em cortes seriados com 3 µm de espessura. Esses cortes foram derivados de um bloco de parafina contendo amostra de ameloblastoma obtido nos arquivos do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia do Centro Universitário do Pará (CESUPA, Belém-PA, Brasil). Por último, foi utilizado o ensaio de formação de invadopódios em substrato fluorescente. Este substrato foi obtido comercialmente (gelatina-FITC). Lamínulas de vidro (18x18 mm) foram cobertas com gelatina fluorescente. As células AME-hTERT foram cultivadas sobre esse substrato de gelatina fluorescente (FITC) em meio de cultura contendo 20% de SBF e mantidas em estufa de CO₂ a 37° C. Após o período de 48 horas, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e submetidas ao protocolo de imunofluorescência indireta simples. Para evidenciar os filamentos de actina utilizou-se rodamina-faloidina conjugada ao fluorocromo Alexa Fluor 568 (1:2000), com o intuito de delinear o contorno da célula e seus prolongamentos em direção ao substrato fluorescente. A montagem das lâminas foi realizada com ProLong Gold e subsequente visualização em microscópio de fluorescência (Scope.A1). **Resultados e Discussão:** Os resultados evidenciaram a expressão da cortactina, TKs-4, TKs-5 e MT1-MMP *in vitro* por imunofluorescência e Western-Blot e *in vivo* por imunohistoquímica. Na linhagem AME-hTERT, por imunofluorescência observou-se que todas as proteínas apresentaram expressão citoplasmática granular. Os ensaios de imunohistoquímica revelaram que todas as proteínas estavam expressas predominantemente no parênquima tumoral, tanto nas células centrais quanto nas células colunares na periferia das ilhas e cordões epiteliais. Além disso, verificou-se pelo ensaio de invadopódio áreas de degradação no substrato fluorescente pelo AME-hTERT. A formação dos invadopódios foi representada por áreas escuras na matriz de gelatina fluorescente. A descoberta de proteínas relacionadas à formação dos invadopódios está associada à invasão e metástase tumoral, aumentando o nosso interesse para tentar desvendar proteínas que estejam envolvidas nos mecanismos de invasão do ameloblastoma. Achados recentes do nosso grupo de pesquisa sugeriram que a cortactina e a MT1-MMP, principais

componentes do invadopódio, podem ter influência no comportamento localmente agressivo do ameloblastoma. Observa-se na literatura vários estudos que investigam a presença dessas moléculas em invadopódios de tumores de mama, próstata e glioblastomas, entre outros. Além disso, nenhum dado foi encontrado na literatura até a presente data sobre a investigação de proteínas adaptadoras no mecanismo de invasão celular do ameloblastoma. A alta expressão de cortactina, TKs-4, TKs-5 e MT1-MMP nessa lesão sugere que essas proteínas têm um papel importante na formação dos invadopódios e por conseguinte no comportamento biológico do ameloblastoma. **Conclusão:** Os presentes resultados revelaram a expressão das principais proteínas formadoras do invadopódio, cortactina, TKs-4, TKs-5 e MT1-MMP no ameloblastoma, indicando que essas moléculas provavelmente têm um papel chave no comportamento biológico desta neoplasia. Estes achados podem contribuir para a realização de tratamentos mais eficazes e diminuir a morbidade dessa neoplasia com o avanço de novos recursos terapêuticos.

Referências Bibliográficas:

- Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moiseiwitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.* 2006 Mar 15;66(6):3034-43.
- Pinheiro JJ, Freitas VM, Moretti AI, Jorge AG, Jaeger RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology.* 2004 Jul;45(1):65-72.
- Murphy DA, Courtneidge SA. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Jul;12(7):413-26.