

PES102 - TAXA DE VIABILIDADE CELULAR APÓS SILENCIAMENTO DE METALOTIONEÍNA 2A EM LINHAGEM DERIVADA DE CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO HUMANO

EDUARDO LUIS DE SOUZA CRUZ¹; CAIO TADASHI SAAB ABE ¹; MARIA SUELI DA SILVA KATAOKA²; JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO²; SÉRGIO DE MELO ALVES JÚNIOR²

eduardo.scruz@outlook.com

¹Graduação, ²Doutorado

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Introdução: O Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) é uma neoplasia maligna relativamente comum, que acomete principalmente as glândulas salivares menores em regiões como o palato. Seu crescimento lento e altamente invasivo tem sido alvo de estudos principalmente se relacionado com altas taxas de metástase, recidiva e significativa morbidade. Substâncias como fatores de crescimento (EGF) e peptídeos (metalotioneína, MT2A) têm sido correlacionadas fortemente com mecanismos de invasão, migração e secreção de proteases (metaloproteinases da matriz, MMPs-2 e -9) no CAC. Essas substâncias comprovadamente formam um ciclo de atividades tumorais que podem influenciar no prognóstico da doença. A metalotioneína (MT) é um sítio intracelular de íons zinco que contribui para a atividade das MMPs na matriz extracelular. Além disso, metalotioneínas têm sido correlacionadas com reparo celular, proliferação, diferenciação e carcinogênese. A superexpressão de MT é relatada em vários tumores como os de tireoide, testículos, próstata, cabeça e pescoço e glândulas salivares. A superexpressão de MT, diretamente relacionada com as MMPs, é justificativa para piores prognósticos e a alta viabilidade em tumores como o CAC. Viabilidade celular é a capacidade de uma unidade morfofuncional em exercer seu metabolismo sem restrições e, assim, conseguir multiplicar-se e propagar seu material genético. Os ensaios de viabilidade celular por MTT visam quantificar as células viáveis, após exposição a fatores extrínsecos, pela quantidade de cristais de formazam precipitados. **Objetivos:** Verificar as taxas de viabilidade celular no Carcinoma Adenoide Cístico humano após silenciamento gênico para metalotioneína (MT2A). **Métodos:** Linhagem celular derivada de CAC humano foi descongelada e transferida para frascos de 25cm² de área cultivável, em meio de cultivo DMEM-F/12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O ensaio com RNA de interferência (siRNA) foi realizado para inibir MT2A na linhagem estudada. Para isso, células CAC2 foram cultivadas em placas de 6 poços até alcançarem 60-80% de confluência. Em sequência, meio de transfecção, reagente de transfecção (lipofectamina) e 30nm de siRNA para MT2A, foram misturados de acordo com as instruções do fabricante, ofertados às células e as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 min. Como controle, outro grupo de células foi transfectado com 30nm de siRNA de sequência “scrambled”, que não induz sinalização de qualquer mecanismo celular. Após o período de incubação, células transfectadas com siRNA para MT2A e “scrambled” (controle) foram lisadas por tampão RIPA e amostras quantificadas foram preparadas para confirmação do silenciamento pelo método de Western Blot. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra e carregadas em gel de poliacrilamida a 20%. Após eletroforese, seguindo o protocolo para SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em Tween-20 a 0,05% em

TBS, e incubadas com anticorpo anti-MT2A. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase foi incubado por um período de 01 hora em temperatura ambiente. Foi utilizado um protocolo de quimioluminescência para revelar a reação em filme radiográfico. Células transfectadas com siMT2A e as células controle foram cultivadas em placas de 96 poços por 24, 48, 72 horas para os ensaios de MTT. As células foram expostas ao MTT, na concentração de 5 mg/mL, diluído em 50µL de DMEM-F/12 sem soro e foram incubadas durante quatro horas a 37⁰C e 5% de CO₂. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado e substituído por 100 µL de DMSO/poço para solubilizar os cristais de formazam. Após 30 minutos a solução de cada poço foi homogeneizada e a absorbância medida em leitor de microplacas padrão com filtro de 595nm. Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados usando o software GraphPad Prism 5. A média de cada grupo foi comparada e organizada em gráficos de retas, tendo os eixos tempo x densidade óptica correlacionados. **Resultados e Discussão:** O ensaio de Western Blot confirmou o silenciamento de MT2A na linhagem estudada. Verificou-se diminuição no tamanho da banda de proteínas da amostra transfectada em comparação ao grupo controle. Quanto ao ensaio de MTT, os grupos apresentaram harmonia nas curvas de absorbância/tempo. A análise estatística não apontou diferença significativa entre os grupos estudados. Notou-se que em 24 horas, os grupos siRNA e “scrambled” apresentaram basicamente a mesma viabilidade (**Conclusão:** Nossos resultados parecem indicar que o silenciamento para MT2A não interfere na viabilidade das células CAC2, embora as atividades tumorais sejam prejudicadas após o silenciamento).

Referências Bibliográficas:

- Deeksha P, Ujjawal S, Shrawan K, Arup KM, Rejendra P. Metallothionein gene expression in renal cell carcinoma. *India J Mol.* 2014. 30(3): 241-4.
- Yeming L, Hairong L, Wenhan C, Ting Y, WeiZhang. EOLA1 protects lipopolysaccharide induced IL-6 production and apoptosis by regulation of MT2A in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2014. 395: 45-51.
- Li K, Zhu ZC, Liu YJ, Liu JW, Wang HT, Xiong ZQ, Shen X, Hu ZL, Zheng J. ZFX knockdown inhibits growth and migration of non-small cell lung carcinoma cell line H1299. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013 Sep 15;6 (11):2460-7.
- Hu P, Huang Q, Li Z, Wu X, Ouyang Q, Chen J, Cao Y. Silencing MAP3K1 expression through RNA interference enhances paclitaxel-induced cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2014 Jan; 41(1):19-24.
- Cheng-Qin W, Feng-Gang X, Yu-Jun L, Xiao-Ming X, Ning W, Jing H, Went-Juan Y. Relation between the expression of mitotic centromere-associated kinesin and progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral and maxillofacial Pathol, Vol 117; 57-65, 2014.*