

PES152 - O FUMO INDUZ A SUPEREXPRESSÃO DE ADAM12, A PROTEÍNA FORMADORA DE INVADOPÓDIO

WALESSA BRASIL DA SILVA¹; MARIA SUELI DA SILVA KATAOKA²; JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO²; SÉRGIO MELO DE ALVES JÚNIOR²

wallessabrazil@hotmail.com

¹Graduação, ²Doutorado

UFPA

Introdução: O carcinoma epidermoide (CE) é o sexto tumor maligno mais comum na região da cabeça e pescoço. Histologicamente exhibe cordões e/ou ninhos epiteliais neoplásicos invadindo o tecido conjuntivo adjacente. A hipóxia intratumoral, característica marcante do CE é um evento molecular caracterizado por queda na concentração de oxigênio resultante de alterações no sistema vascular tumoral. A hipóxia intratumoral ativa direta e indiretamente as proteínas HIF1A, NOTCH1 e ADAM12, as quais influenciam drasticamente o comportamento biológico de tumores malignos. O microambiente de hipóxia estabiliza o nível de HIF1A elevando a taxa do ligante JAG2, o qual liga-se ao seu receptor transmembrana NOTCH1, ativando sua sinalização. A sinalização de NOTCH1 recruta a proteína γ -secretase, responsável pela clivagem do domínio intracelular de NOTCH1 (DICN) e sua translocação para o núcleo, deste modo aumentando o nível de ADAM12; uma metaloproteinase dependente de zinco. Evidências científicas relatam que o monóxido de carbono (CO), presente na fumaça inalada durante o fumo provoca hipóxia (hipóxia tóxica), resultado da ligação à hemoglobina, formando a molécula carboxihemoglobina (COHb), e deste modo impedindo o transporte de oxigênio realizado pela hemoglobina, resultando em queda na concentração de O₂. Portanto, supõem-se que amostras de CE de fumantes apresentem maior expressão de ADAM12 em comparação aos não fumantes, devido à relevante exposição ao monóxido de carbono. **Objetivos:** Assim, o objetivo deste estudo foi analisar e comparar a expressão de ADAM12 em indivíduos com CE, fumantes (G1) e não fumantes (G2). **Métodos:** Este estudo foi aprovado pelos: Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola (Parecer n°: 904.248) e Comitê de Ética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (ICS-UFPA. Parecer n°: 877.291). Foram selecionados randomicamente 45 amostras em blocos de parafina (G1=37 e G2=8) provenientes de pacientes diagnosticados (CE) e tratados entre 2006 e 2008, no hospital referência em tratamento oncológico da rede de saúde pública no estado do Pará, Hospital Ophir Loyola, Belém, Pará, Brasil. A imunohistoquímica foi realizada a fim de verificar e analisar a possível expressão de ADAM12 em G1 e G2, por meio da técnica da imunoperoxidase. As amostras teciduais em blocos de parafina foram seccionadas continuamente em 4 μ m de espessura, e posteriormente colhidos em lâminas tratadas com organossilano (3-aminopropil-trietosilano, Sigma® Chemical. Co. St. Louis, MO, USA). As secções foram diafanizadas em xilol e hidratadas em sequência decrescente de soluções de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada pela imersão das secções em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à 3% e álcool metílico, na proporção 1:1 durante 20 minutos. Posteriormente, a recuperação antigênica foi realizada em tampão de citrato (pH 6,0) em câmara de pressão Pascal (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 30 segundos. Após esta etapa, foi efetuada a eliminação de anticorpos inespecíficos com albumina de soro bovino a 1% (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e solução salina tamponada com fosfato (PBS) por uma hora. Em seguida, as secções foram incubadas com Anti-ADAM12 (Goat Anti-ADAM12 polyclonal antibody ab28747, 0,5mg/ml, Abcam, Paisley, UK) em diluição

de 1:133. Após esta etapa, o anticorpo secundário foi incubado por 30 minutos (EnVision Plus, Dako®, Carpinteria, CA, USA). A diaminobenzidina (Dako®, Carpinteria, CA, USA) foi utilizada como cromógeno, e logo após, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e montados em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA). O Plug-in Color deconvolution e o software de domínio público ImageJ foram utilizados para verificar a imunexpressão de ADAM12, respectivamente segmentando e quantificando em fração de área marcada (%), as áreas pigmentadas por diaminobenzidina. As imagens de campo claro quantificadas (5 áreas randomicamente selecionadas de cada amostra) foram adquiridas em microscópio AxioScope A1, equipado com câmera CCD AxioCam HRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e objetiva de 40x. O padrão de imunomarcção foi classificado da seguinte forma: quanto a localização: nuclear e/ou citoplasmático, quanto a intensidade fraca (< 50%) e forte ($\geq 50\%$) e quanto a distribuição em uniforme e pontual. O software GraphPad Prism 6 foi utilizado para realização de testes estatísticos. A diferença de imunexpressão de ADAM12 entre os grupos G1 e G2 foi avaliada pelo teste estatístico T independente (distribuição de dados normal).

Resultados e Discussão: Ambos os grupos apresentaram imunexpressão de ADAM12, apresentando padrão de marcação no grupo G1 de forma intensa, uniforme e citoplasmática no parênquima tumoral (marcação média de 59.44%), enquanto que no estroma apresentou-se de forma fraca, nuclear e pontual. O grupo G2 exibiu marcação fraca, citoplasmática e uniforme no parênquima tumoral (31.75%) e no estroma foi nuclear e rara. Após análise estatística, ADAM12 revelou elevada imunexpressão nas amostras de G1 quando comparadas a G2 ($p = 0.0003$). As metaloproteinases são importantes mediadores do processo de formação de invadopódios; protrusões da membrana plasmática de células tumorais com atividade proteolítica, responsáveis pela degradação da matriz extracelular, e conseqüente processo de metástase. Ademais, ADAM12 desempenha importante papel na ativação de proteínas ancoradas a membrana, tais como Delta-like 1 e certos fatores de crescimento epidérmico; como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador- α (TGF- α) e o fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HBEGF), atividades estreitamente relacionadas ao crescimento e conseqüente progressão tumoral. **Conclusão:** Estes resultados sugerem importante associação do fumo na superexpressão de ADAM12. Provavelmente, a superexpressão da proteína em G1 resultou da elevada exposição ao monóxido de carbono, aumentando o nível de hipóxia intratumoral pré-existente, fato que possivelmente resultaria em elevado grau de progressão tumoral, relevante risco de metástase e conseqüentemente pior prognóstico em comparação a G2.

Referências Bibliográficas:

Diaz B, Yuen A, Iizuka S, Higashiyama S, Courtneidge SA. Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia. *The Journal of cell biology*. 2013;201(2):279-92.

Liu M, Poo WK, Lin YL. Pyrazine, 2-ethylpyridine, and 3-ethylpyridine are cigarette smoke components that alter the growth of normal and malignant human lung cells, and play a role in multidrug resistance development. *Experimental and molecular pathology*. 2014;98(1):18-26.

Frohlich C, Klitgaard M, Noer JB, Kotsch A, Nehammer C, Kronqvist P, et al. ADAM12 is expressed in the tumour vasculature and mediates ectodomain shedding of

several membrane-anchored endothelial proteins. *The Biochemical journal*. 2013;452(1):97-109.

Li H, Solomon E, Duhachek Muggy S, Sun D, Zolkiewska A. Metalloprotease-disintegrin ADAM12 expression is regulated by Notch signaling via microRNA-29. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(24):21500-10.

Olea E, Ferrer E, Prieto-Lloret J, Gonzalez-Martin C, Vega-Agapito V, Gonzalez-Obeso E, et al. Effects of cigarette smoke and chronic hypoxia on airways remodeling and resistance. Clinical significance. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2011;179(2-3):305-13.