

ENSAIO DE INVASÃO COM LINHAGEM CELULAR AME-TERT

Thaianna Lima de Oliveira¹; Raissa Pinheiro de Mendonça¹; Maria Sueli da Silva Kataoka²; Sergio de Melo Alves Junior²; João de Jesus Viana Pinheiro²

¹Graduação, ²Doutorado
Universidade Federal do Pará (UFPA)
thaiannalima@hotmail.com

Introdução: Os tumores odontogênicos são lesões que possuem uma variedade de características histopatológicas, clínicas e radiográficas. Dentre esses tumores, o ameloblastoma, se destaca por sua invasividade local.^{1,2} O ameloblastoma é um dos tumores odontogênicos de maior ocorrência na região maxilofacial. Embora seja um tumor benigno, apresenta comportamento invasivo, grande capacidade de destruição óssea e alta taxa de recidiva. Sabe-se que os custos do tratamento e recuperação de pacientes acometidos por ameloblastoma são muito altos, e durante o tratamento, pode ocorrer a necessidade de realização da ressecção mandibular para a remoção do tumor, gerando alterações estéticas e funcionais importantes, com a necessidade de cirurgias reconstrutivas utilizando protótipos e placas de osteossíntese, aumentando os índices de morbidade. A invasão neoplásica e a metástase dependem da habilidade de células tumorais para remodelar e degradar a MEC. A degradação focal é mediada por invadopódios, protrusões celulares semelhantes a dedos, relacionados ao início da invasão tumoral. As proteínas, NOTCH1, ADAM-12, HIF-1 α e HB-EGF, em conjunto, têm sido relacionadas com a formação de invadopódios. Neste sentido, o estudo de proteínas como NOTCH1, ligada aos processos de invasividade e à formação de invadopódio se torna fundamental. NOTCH1 se apresenta como uma proteína chave do mecanismo de formação de invadopódios e, por conseguinte, de promover a invasão celular. Os receptores de NOTCH e seus ligantes são expressos nas células neoplásicas e no estroma e, por conseguinte, podem mediar qualquer sinalização homotípica entre células neoplásicas ou de sinalização heterotípica entre as células neoplásicas e as células do estroma.^{3,4}

Objetivos: Investigar mecanismos de ação de NOTCH1 in vitro assim como o comportamento biológico de células neoplásicas cultivadas (AME-hTERT) apresentando NOTCH1 silenciada por siRNA, em condições de normóxia utilizando ensaios de invasão.

Métodos: Para isso foi realizado inicialmente o silenciamento do gene NOTCH1 por siRNA, onde as células foram cultivadas em placas de 6 poços até alcançarem 50% de confluência. A seguir, meio de transfecção (Optimen), reagente de transfecção (Lipofectamina 2000) e siRNA para NOTCH1, na concentração de 50nM, foram misturados e incubados à temperatura ambiente por 30min, de acordo com as instruções do fabricante. Como controle, outro grupo de células foi transfectado com 50nM de siRNA de sequência “scrambled”, que não induz degradação de qualquer mensagem celular. Após o período de incubação, as células transfectadas com siRNA para NOTCH1 e “scrambled” (controle) foram colhidas das placas e submetidas à técnica de Western blot, para observar se o tratamento com siRNA diminuiu a expressão desse receptor. Western Blot foi utilizado para confirmar a depleção do gene alvo. Nesse experimento as células foram cultivadas em placas de 6 poços até alcançarem a confluência. Em seguida foram lisadas em tampão RIPA, contendo inibidores de protease, e foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 min a 4oC, e o sobrenadante foi recolhido. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) e a eletroforese seguiu o protocolo em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra e carregadas em gel de poliacrilamida a 10%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em Tween-20 a 0,05%, e

incubadas com anticorpo anti-NOTCH1. Esse anticorpo primário foi detectado pelo anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Um protocolo de quimioluminescência (ECL kit,) foi utilizado para revelar a reação em filmes radiográficos. Para possibilitar a marcação com diferentes anticorpos, as membranas foram “stripped” com “Restore Western Blot Stripping Buffer” e submetidas à nova marcação. Para verificar a influência da depleção do gene NOTCH1 sobre a invasão celular utilizou-se ensaios de invasão em sistema de câmaras bipartites (Neuroprobe). Foi empregado o sistema de câmaras bipartites de 10 poços utilizando membrana de policarbonato porosa coberta por 5µL de matrigel na concentração de 14µg/mL. Poços da câmara inferior foram preenchidos com DMEM-F12 e 10% de soro fetal bovino. Neste experimento, células com a expressão de NOTCH1 reduzida por siRNA (15x10⁴ células/poço), e ressuspensas com DMEM-F12 e 0,5% soro fetal bovino, foram colocadas na câmara superior sobre a membrana coberta por matrigel. As câmaras foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 48h, para que ocorresse a digestão do matrigel e invasão das células da câmara superior para a inferior. Após esse período, a membrana foi removida e sua porção superior foi delicadamente raspada para a remoção de células que não invadiram. As células localizadas na porção inferior foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS e coradas com solução de violeta cristal a 0,2% em metanol a 20%. A aquisição de imagens utilizando máquina digital acoplada a um microscópio (aumento final de 100x) permitiu a contagem das células que invadiram. **Resultados e Discussão:** O silenciamento do gene NOTCH1 foi comprovado por Western Blot e utilizando o ensaio de invasão, pôde-se perceber uma menor invasão das células quando o gene alvo foi depletado quando comparadas com o controle (sequência “scrambled”) p<0,01. A proteína NOTCH1 vem sendo bastante estudada, por ter uma participação efetiva nas neoplasias, ao estar ligada com vários processos de carcinogêneses, que vão desde invasão a proliferação celular. O silenciamento no NOTCH1 está relacionado com um efeito anti-invasão e anti-metástase em casos de carcinoma epidermoide localizado na língua, por este trabalho e por todo seu papel no desenvolvimento neoplásico, vê-se a importância de se realizar o silenciamento desta proteína. Baseado nesses resultados, os experimentos de immunoblot foram realizados para detectar a expressão, o peso molecular e a quantidade de proteínas de interesse. Devido a proteína NOTCH1 estar relacionada ao processo da formação de invadopódio e, conseqüentemente, de invasão tumoral^{3,4,5}, os resultados encontrados enfatizam a possível relação desta proteína com o potencial de invasão das neoplasias, assim como após o silenciamento desta proteína as células passaram a invadir em proporções bem menores do que as células do controle. Esses resultados podem ajudar na formação de fármacos ligados ao silenciamento da proteína NOTCH1, e assim ajudar no processo de carcinogênese do Ameloblastoma. A forte relação do NOTCH1 com o estado de hipóxia intratumoral aponta para uma maior invasão das células quando incubadas em câmara de hipóxia em um ambiente com CO₂ em concentração menor, assim como também se espera uma menor invasão das células silenciadas. **Conclusão:** Os resultados obtidos demonstram que a proteína NOTCH1 está relacionada com o processo de carcinogênese ao se observar que, com seu silenciamento, as linhagens celulares Ameh TERT, HSG e HT1080 apresentaram menor invasão tumoral quando comparadas com as não transfetadas com siRNA. Assim sugere-se uma forte relação do NOTCH1 com a invasão no estado de normóxia. Logo com o silenciamento alcançado no experimento de siRNA para o NOTCH1 e confirmado com Western Blot, percebeu-se pelo ensaio de invasão que as células transfetadas invadiram menos que as não silenciadas.

Referências:

1. MORGAN, P.R. Odontogenic tumors: a review. *Periodontol.* 2000. 2011 Oct;57(1):160-76.
2. ANTONOGLU, G.N.; SÁNDOR, G.K. Recurrence rates of intraosseous ameloblastoma of the jaws: A systematic review of conservative versus aggressive treatment approaches and meta-analysis of non-randomized studies. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* 2015 Jan;43(1):149-57.
3. DÍAZ, B.; YUEN, A.; LIZUKA, S.; HIGASHIYAMA, S.; COURTNEIDGE, S.A. Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia. *J Cell Biol.* 2013 Apr 15;201(2):279-92.
4. ROY R.; RODIG, S.; BIELENBERG, D.; ZURAKOWSKI, D.; MOSES, MA. ADAM12 transmembrane and secret isoforms promote breast tumor growth: a distinct role for ADAM12-S protein in tumor metastasis. *J Biol Chem.* 2011 Jun 10; 286(23):20758–68.
5. PINHEIRO, J.J.; NASCIMENTO, C.F.; FREITAS, V.M.; DE SIQUEIRA, A.S.; JUNIOR S.M.; JAEGER, R.G. Invadopodia proteins, cortactin and membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) are expressed in ameloblastoma *Histopathology.* 2011 Dec;59(6):1266-9