

## ANÁLISE DA PROTEÍNA KIN EM CARCINOMA DE BEXIGA HUMANO

Stephane Haracenko (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Anelise Cardoso Ramos (Co-orientadora) e-mail: [anelise.andre@gmail.com](mailto:anelise.andre@gmail.com), Maria Aparecida Fernandez (Orientadora) e-mail: [aparecidafernandez@gmail.com](mailto:aparecidafernandez@gmail.com)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Área: Ciências Biológicas/Bioquímica.**

**Palavras-chave:** Câncer, KIN, ciclo celular.

### Resumo

Câncer é uma doença cujos casos descritos tem se elevado durante as últimas décadas. Causado por células tumorais que podem se originar por instabilidade genômica, por mutações, erro na sequência do ciclo celular, sendo que proteínas de reparo tem papel fundamental na correção de erros, evitando neoplasias. Uma destas proteínas é a KIN, descrita como superexpressa em câncer de mama entre outros tumores analisados. Com o objetivo de se analisar a expressão da proteína KIN em câncer de bexiga, o qual é o mais comum do sistema urogenital, a análise, em células de carcinoma de bexiga humano (linhagem EJ30) em progressão de divisão celular, foi determinada. Foi observado que a superexpressão da proteína KIN ocorre nos tempos entre 0h e 2h do início do ciclo celular, tempo este que deve ocorrer a proliferação celular.

### Introdução

O câncer é uma doença que ocorre tanto por fatores genéticos quanto ambientais, os índices dessa doença vêm se elevando nas últimas décadas (PELUCCHI et al, 2006). O câncer de bexiga é o tipo mais comum do sistema urogenital acometendo principalmente o sexo masculino (PELUCCHI et al, 2006). A fim de evitar danos ao material genético, proteínas de reparo com mecanismos específicos estão presentes na célula, e se relacionam com as etapas dos processos fisiológicos, como o ciclo celular (COHEN; WALKER, 2011). Dentre essas proteínas está a KIN, também conhecida como Kin17. Essa proteína foi descrita primeiramente em 1989 em células de rato com o uso de anticorpos contra a proteína de reparo RecA de *Escherichia coli* (ANGULO et al., 1989). A KIN já foi descrita como superexpressa diversas células tumorais (RAMOS et al., 2015). Estudos moleculares vêm avançando para identificação precoce e tratamento de células tumorais (YOKOTA, 2000), com isso o estudo visa identificar a

expressão da proteína KIN e identificação com o período do ciclo celular em que encontra mais expressa.

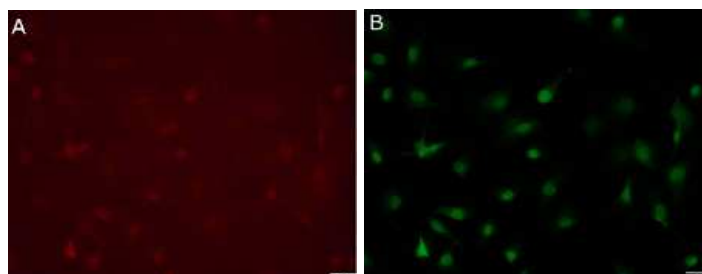
### Materiais e métodos

As células utilizadas foram de carcinoma de bexiga humano da linhagem EJ30 (gentilmente cedidas pelo Dr Torsten Krude, Cambridge University, UK). As células foram cultivadas meio RPMI em pH 7,4 com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Para sincronização, as células foram transferidas para placas com lamínulas em meio com 0,5% de soro fetal bovino durante 5 dias. Os primeiros testes de sincronização foram realizados em intervalos de tempo entre 0h e 24h após adição de 10% soro fetal bovino. Um intervalo de tempo menor também foi testado de 0h a 2h. Foi adicionado 12uL de BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine; Invitrogen) a 10mM, e a cada intervalo as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Após a fixação, foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% por 10 minutos e bloqueadas com BSA 3% e soro de cabra 20% por uma hora. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-BrdU (Rat anti BrdU – Biorad) e anti-kin (mouse anti-kin K58 – Santa Cruz Biotechnology) e os secundários Alexa Fluor 594 (goat anti rat - Molecular Probes) e Alexa fluor 488 (goat anti mouse- Molecular Probes), além do DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) para marcador de ácidos nucleicos. As lamínulas foram montadas e observadas no microscópio Olympus FSX100.

### Resultados e Discussão

As primeiras análises foram realizadas nos intervalos de 4 e 8 horas, nos quais não foram obtidos resultados que permitissem uma análise mais detalhada. Diante destes resultados, testamos intervalos menores de tempo: 0h, 30min, 1h, 1h30min e 2h.

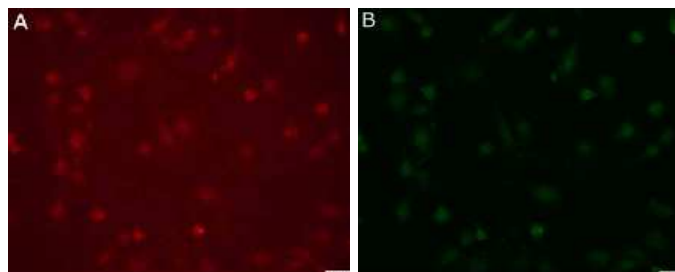
No tempo 0h, foi detectada a proteína KIN no citoplasma e no núcleo, podendo indicar que as células não deveriam estar em período de proliferação (Figura 1).



**Figura 1:** Imunolocalização da proteína KIN em células da linhagem EJ30 no tempo 0h. (A) BrdU, (B) Proteína KIN. Barra: 32 um.

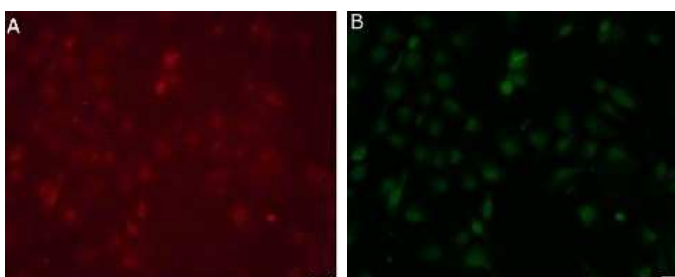
No tempo de 30 minutos, nota-se que a proteína está predominantemente localizada no núcleo, com a marcação de BrdU mais intensa (Figura 2). Esse

resultado sugere que a KIN está migrando do citoplasma para o núcleo, o que pode indicar início da fase S do ciclo celular.



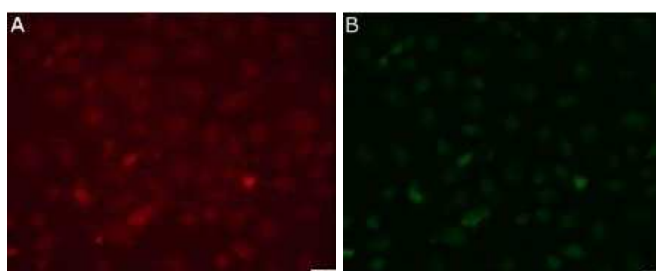
**Figura 2:** Imunolocalização da proteína KIN em células da linhagem EJ30 no tempo 30 minutos. (A) BrdU, (B) Proteína KIN. Barra: 32  $\mu$ m.

Após 1h, verifica-se que a marcação da KIN é mais intensa no núcleo, ocorrendo também um aumento na detecção do BrdU, como observado na Figura 3. Neste tempo, é possível que a célula esteja na fase de proliferação.



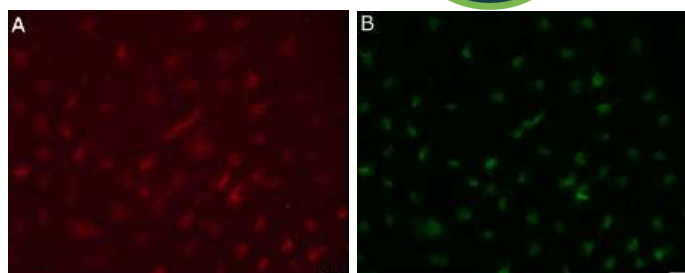
**Figura 3:** Imunolocalização da proteína KIN em células da linhagem EJ30 no tempo 1 hora. A) BrdU, (B) Proteína KIN. Barra: 32  $\mu$ m.

Analisando a Figura 4, no tempo de 1h30min, a intensidade da marcação da proteína é menor. Esse fato deve indicar o término da fase de proliferação, no qual a célula deve estar com menor taxa de replicação.



**Figura 4:** Imunolocalização da proteína KIN em células da linhagem EJ30 no tempo 1h30min. A) BrdU, (B) Proteína KIN. Barra: 32  $\mu$ m.

Analisando o último tempo de 2h (Figura 5) tanto a proteína KIN quanto o BrdU elevam sua intensidade, ou seja, voltam a se proliferar.



**Figura 5:** Imunolocalização da proteína KIN em células da linhagem EJ30 no tempo 2 horas. (A) BrdU, (B) Proteína KIN. Barra: 32  $\mu$ m.

## Conclusões

Os resultados obtidos até o momento apontam que possivelmente as células de carcinoma de bexiga humano (linhagem EJ30) estão em estágio de proliferação celular aproximadamente em 1h, devido a maior detecção da proteína KIN no núcleo e maior incorporação do BrdU.

## Agradecimentos

Agradeço ao órgão financiador CNPq pela condição de bolsa e oportunidade do projeto, bem como a co-orientação e orientação pelos ensinamentos e ao laboratório LORF pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

## Referências

ANGULO, J. F. et al. Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to E. coli RecA protein. **Mutation Research**, v. 217, n. 2 p. 123-134, 1989.

COHEN, S.E.; WALKER, G.C. New discoveries linking transcription to DNA repair and damage tolerance pathways. **Landes Bioscience**. v.2, n.1, p. 37-40, 2011.

PELUCCHI, C. et al. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. **Nature Clinical Practice Urology**, v.3, n.6, p.327-340, 2006.

RAMOS, A. C. et al. The kin17 protein in Murine Melanoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 27912–27920, 2015.

YOKOTA, J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**.v.21, n.3, p.497-503, 2000.