

## PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE WESTERN BLOT ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DA MMP-9 EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Mariana Arrevolti (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles, Cristiane Suemi Shinobu Mesquita, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Vânia Ramos Sela da Silva (Orientador), e-mail: vaniasela@gmail.com.

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

**Ciências da Saúde - Farmácia**

**Palavras-chave: Neoplasia da mama, metaloproteinase de matrix, imunoblot**

**Resumo:** O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais incidente em mulheres no Brasil e no mundo. Um dos desafios enfrentados nesse câncer é a alta taxa de mortalidade em razão dos elevados índices de metástase. Este processo se dá pela desestruturação da membrana basal, e as metaloproteinases de matriz (MMPs) possuem um importante papel nesse processo. Dentre as MMPs, a MMP-9 exerce uma função predominante na degradação do colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, sendo esta a primeira estrutura a ser degradada durante o processo de invasão das células neoplásicas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de Western blot (WB) no laboratório de Citologia Clínica para avaliar a expressão da MMP-9 em células de CM. Para a padronização da técnica, foram utilizadas as linhagens celulares de CM: MDA-MB-231 e MCF-7. Foram feitos testes avaliando tanto o sobrenadante quanto o lisado celular para avaliação da expressão de MMP-9. A amostra do sobrenadante contendo soro apresentou os melhores resultados, sendo utilizada para padronizar a técnica. Para a  $\beta$ -actina, utilizada como controle, a técnica foi efetiva, confirmando a padronização da técnica de WB.

### Introdução

O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais incidente em mulheres no Brasil e no mundo. No ano de 2018, foram estimados 59.700 casos novos no Brasil. As causas dessa enfermidade podem ser decorrentes de aspectos ambientais e comportamentais, fatores da história reprodutiva e hormonal e/ou aspectos genéticos, principalmente com alterações nos genes BRCA1 e BRCA2 (INCA, 2019).

Apesar dos esforços realizados pelo Ministério da Saúde com campanhas de prevenção, permitindo a expansão do acesso à mamografia e aos recursos para tratamento, a maioria das detecções do CM é realizada tarde, favorecendo o agravamento da doença, devido ao grande risco de metástase (INCA, 2019). A metástase é um processo em cascata decorrente de um descontrole no crescimento celular com penetração da membrana basal, em consequência da desestruturação desta, facilitando a migração das células neoplásicas do tumor original, podendo

esta ser ocasionada pela ação das metaloproteínas de matriz (MMPs) (KLASSEN et al., 2018).

As MMPs são um grupo de endopeptidases dependentes de zinco para sua ação catalítica, estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos, sendo pouco expressas em tecidos normais e aumentadas na maioria das neoplasias malignas (BAI et al., 2018). A MMP-9 exerce um papel predominante na degradação do colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, permitindo a invasão direta do carcinoma por meio da ruptura desta estrutura (KLASSEN et al., 2018). Logo, moléculas-alvo, como a MMP-9 podem ajudar na classificação da doença, visto ser um importante biomarcador de prognóstico no CM, bem como auxiliar na busca de novos alvos terapêuticos para este câncer.

A técnica de Western Blot (WB) é utilizada na detecção, separação e semi-quantificação de diferentes proteínas, baseada na separação destas a partir de seu peso molecular e carga elétrica, através da eletroforese em gel (KURIEN e SCOLFIELD, 2006). Após a eletroforese, as proteínas são transferidas para uma membrana, que é incubada com uma solução contendo anticorpos para a proteína de interesse, resultando na formação de uma banda para cada detecção (MAHMOOD e YANG, 2012).

Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo padronizar a técnica de WB no laboratório de Citologia Clínica para avaliar a expressão da MMP-9 em células de CM.

## Materiais e métodos

Inicialmente, realizou-se o plaqueamento das linhagens celulares de CM (MDA-MB-231: linhagem celular tumoral de mama negativa para receptores de estrogênio, progesterona e HER-2 e MCF-7: linhagem celular tumoral de mama positiva para receptores de estrogênio, progesterona e HER-2) em placa de 6 poços com meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e 0.5 U/mL de penicilina/streptomina, e incubadas em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Assim que formaram uma monocamada confluenta, o meio destas foi trocado para o meio DMEM puro.

### Quantificação de proteínas

Foi preparada uma solução com 10mL de RIPA (solução tampão para lise e extração de proteínas) e adicionado o inibidor de fosfatase e protease (Thermo Scientific, EUA). Os poços foram lavados com PBS puro, e adicionou-se 150µL da solução recém preparada, em seguida, realizou-se a raspagem das células. As células foram então, transferidas para seus respectivos *ependorfs* e centrifugadas assim como os meios (sobrenadantes). As amostras foram congeladas até o momento do uso. Posteriormente, as concentrações de proteínas foram determinadas por um ensaio comercial segundo o *kit* BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EUA).

### Preparo da corrida e transferência para a membrana

Quantidades equivalentes de proteínas contidas nas amostras foram adicionadas em *ependorfs* e acrescidas de solução redutora e de LDS para um volume total de 60µL, em seguida, colocadas em banho a 70°C por 10 minutos. Para a separação das proteínas foi utilizado o equipamento Bolt™ Mini Gel Tank –

B4477599 (Life Technologies), com tampão de corrida e gel de poliacrilamida Invitrogen Bolt 4–12% Bis-Tris Plus. Foram adicionados 60µL das amostras em cada poço do suporte, além do padrão proteico pré-corado SeeBlue™ Plus2, Invitrogen™. Após o término da migração no gel foi feita a transferência para a membrana utilizando o equipamento e instruções do iBlot® 2 Gel Transfer Device-IB21001 (Life Technologies). Para confirmar a transferência das proteínas para a membrana, a mesma foi corada com solução de Ponceau S.

#### Marcação com anticorpos e revelação da membrana

Esse passo foi feito segundo instruções do iBind™ Western Device-SFL1000 (Life Technologies). Foi preparada a solução 1X iBind HRP e as diluições dos anticorpos sendo a do anticorpo primário (Mouse anti-human MMP-9 monoclonal antibody, MerckMillipore) 1:100, e do anticorpo secundário (Mouse IgG, Thermo Scientific) de 1:1000. O controle utilizado foi o anticorpo anti-β-actina (Mouse Monoclonal β-actin Antibody, Life Technologies) 1:665. A membrana foi inserida no equipamento iBlot2 Western Device e nos poços correspondentes foram adicionados as soluções e os anticorpos preparados e incubados por 2,5 horas. Após essa fase, a membrana foi lavada com água destilada e foi realizado o processo de detecção utilizando o *kit* Novex HRP Substrato Chromogenic TMB, Invitrogen, EUA.

## Resultados e Discussão

Para padronização do WB, foram utilizados diferentes protocolos, variando concentração de anticorpos, tempo de incubação, tipo e quantidade de amostra, com o objetivo de ajustar tais parâmetros para que o protocolo se adequasse às necessidades do ensaio. Além disso, foi utilizado o controle, β-actina, por ser uma proteína que é expressa em praticamente todos os tipos celulares, sendo utilizada como controle de carga. Assim, foi possível verificar com maior precisão que as cargas do gel e da amostra estavam adequadas, para que dessa forma as proteínas fossem carregadas igualmente, como pode ser visto na figura 1. A técnica de WB também demonstrou ser eficaz em relação à passagem das proteínas do gel para a membrana, uma vez que, tal transferência pode ser verificada através da coloração de Ponceau S, bem como a marcação da banda relacionada a presença da MMP-9 para ambos os tipos celulares (MCF-7 e MDA-MB-231), como pode ser visto na figura 2.



Figura 1. Expressão da β-actina nas linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7

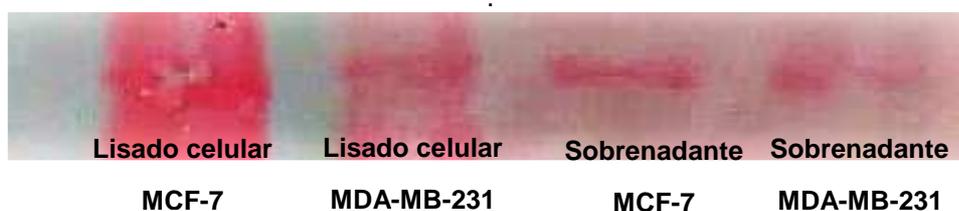


Figura 2. Membrana de Nitrocelulose corada com Ponceau S indicando banda formada pela MMP-9.

Para a padronização, inicialmente foram testadas as amostras contendo o lisado celular, no entanto, sabe-se que as MMPs são produzidas nas células e secretadas, dessa forma, também foi feita a análise utilizando os meios (sobrenadantes) no qual elas foram plaqueadas. É sabido que a forma encontrada no interior da célula é a forma de zimógeno, isto é, enzima inativa, diante disso, há um maior interesse em utilizar os sobrenadantes das células, no qual a MMP-9 pode ser encontrada em sua forma inativa e ativa. Também foram feitos testes, utilizando os sobrenadantes com e sem soro e com e sem lavagem com PBS. Realizou-se a quantificação de proteínas segundo a metodologia descrita, atestando a diferença de concentração destas em ambas amostras. Até o momento, a amostra do sobrenadante contendo soro pareceu ser a melhor forma para padronização da técnica.

## Conclusões

Diante dos resultados obtidos, é possível confirmar a padronização da técnica de WB, uma vez que houve presença de marcação no controle  $\beta$ -actina, bem como a confirmação da transferência das proteínas para a membrana correspondente ao peso molecular da MMP-9 em ambas as amostras.

## Agradecimentos

Ao CNPq e a Universidade Estadual de Maringá pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

## Referências

BAI, X. et al. Krüppel-like factor 9 down-regulates matrix metalloproteinase 9 transcription and suppresses human breast cancer invasion. **Cancer letters**, v. 412, p. 224-235, 2018.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/Ministério da Saúde. **A situação do câncer de mama no Brasil**: Síntese de dados de sistemas de informações. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

KLASSEN, L. M. et al. MMP9 gene expression regulation by intragenic epigenetic modifications in breast cancer. **Gene**, v. 642, p. 461-466, 2018.

KURIEN, B. T., SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 283-293, 2006.

MAHMOOD, T., YANG, P. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **North American journal of medical sciences**, v. 4, n. 9, p. 429, 2012.