

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA POR MEIO DA EXPRESSÃO DA MMP-9 EM CÉLULAS TUMORAIS E NÃO TUMORAL DE MAMA

Giordanna Chiqueto Duarte (PIBIC/FA), Mariana Arrevolti, Lais de Sena Marques, 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: câncer de mama, metaloproteinase de matriz, imunocitoquímica

Resumo:

O câncer de mama (CM) é o câncer mais comum e a causa mais frequente de morte por câncer entre mulheres em todo o mundo. A metástase é uma das principais causas das altas taxas de morbimortalidade dessa neoplasia. No processo de invasão tumoral e metástase, uma das etapas cruciais é a degradação e/ou remodelação da matriz extracelular (MEC). Devido a capacidade das metaloproteinases de matriz (MMPs) hidrolisarem uma variedade de proteínas da MEC, estas têm sido associadas ao processo de metástase. Dentre as MMPs mais estudadas está a MMP-9, responsável por degradar principalmente o colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal, sendo esta a primeira estrutura a ser degradada durante o processo de invasão das células neoplásicas. Assim, este trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de imunocitoquímica no laboratório de Citologia Clínica por meio da expressão da MMP-9 em células tumorais e não tumoral de mama. Para isso, foram utilizadas as linhagens celulares de CM, MDA-MB-231 e MCF-7, e não tumoral de mama, MCF-10A. A concentração do anticorpo primário de 1:300, foi escolhida para padronização da técnica, pois foi a que apresentou coloração ideal com maior especificidade. Ambas as linhagens celulares de CM apresentaram marcação, indicando a expressão da MMP-9, enquanto a linhagem celular não tumoral de mama apresentou marcação fraca ou ausente.

Introdução

O câncer de mama (CM) é o câncer com maior prevalência entre as mulheres em todo o mundo, depois do câncer de pele não melanoma e é a causa mais frequente de morte por câncer nestas (NAGINI, 2017). O

processo de metástase é uma das principais causas de morte da doença (DE ALMEIDA, 2015). Uma das etapas fundamentais envolvidas na invasão tumoral e metástase é a degradação da matriz extracelular (SEMOLIN, 2015), sob o efeito de enzimas proteolíticas, dentre as quais as metaloproteinases da matriz (MMP) desempenham grande importância. Dessa forma, a MMP-9 se mostra relevante por degradar principalmente o colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal, sendo esta a primeira estrutura a ser degradada durante o processo de metástase. Assim, o aumento na expressão e a atividade da MMP-9 podem estar proporcionalmente relacionadas à agressividade da neoplasia e mau prognóstico no CM (BAI, 2018).

A técnica de imunocitoquímica pode ser utilizada na detecção de marcadores tumorais, e com isso, se torna uma ferramenta importante como método diagnóstico complementar do câncer, na avaliação do seu prognóstico, bem como para direcionar o tipo de tratamento. Ela se baseia na utilização de anticorpos como reagentes específicos capazes de diferenciar e estabelecer ligação com elementos que funcionam como antígenos expressos em cada tipo de tumor (DE ALMEIDA SALLES, 2009). Assim, objetivou-se padronizar a técnica de imunocitoquímica no laboratório de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá por meio da expressão da MMP-9 em linhagens celulares tumorais e não tumoral de mama.

Materiais e métodos

Reativação e manutenção das linhagens celulares

Inicialmente, foi realizada a reativação das linhagens celulares de CM (MCF-7: positiva para receptores de estrogênio, progesterona e HER-2 e MDA-MB-231: negativa para receptores de estrogênio, progesterona e HER-2) e linhagem não tumoral de mama (MCF-10A). As linhagens celulares tumorais foram mantidas em meio de crescimento DMEM e a linhagem não tumoral, em DMEM/F12, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 2,5µg/mL de anfotericina B à 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiam, aproximadamente, 80% de confluência.

Padronização da técnica de imunocitoquímica nas linhagens celulares de câncer de mama e linhagem celular não tumoral de mama

Para a padronização da técnica de imunocitoquímica ambas as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 12 poços contendo uma lâmina redonda ao fundo de cada poço, na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL e incubadas durante 24 horas. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido dos poços e adicionou-se formalina 4%, deixando que essa agisse durante

30 minutos, para fixação das células, e então os poços foram lavados com PBS. Na sequência, as lamínulas foram colocadas em uma placa de Petri, onde as células foram circuladas com caneta hidrofóbica, para limitar o local da reação, e foi adicionado peróxido de hidrogênio, reagente de bloqueio da peroxidase endógena, durante 10 minutos. Decorrido esse tempo, as lâminas foram lavadas em tampão PBS, perfazendo dois ciclos de três minutos cada. Assim que o excesso de PBS foi retirado, aplicou-se o “ProteinBlock”, para bloqueio de reações inespecíficas, o qual agiu durante 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas durante 3 minutos com PBS e então o anticorpo primário (Mouse anti-human MMP-9 monoclonal antibody, Merck Millipore), testado em diferentes concentrações, foi adicionado e incubado *overnight* em câmara úmida. No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS. E então, aplicou-se o “Complement” (anticorpo secundário), o qual agiu por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas 2 vezes em tampão, sendo 3 minutos cada banho. Posteriormente foi aplicado o “HRP”, composto de amplificação da reação, com incubação de 15 minutos, e repetiu-se a lavagem com PBS 4 vezes com ciclos de 3 minutos. Então, aplicou-se o DAB diluído (1:50), por 10 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as células foram lavadas com PBS 4 vezes com ciclos de 3 minutos, e contra-coradas com hematoxilina por 3 minutos. Assim, retirou-se o excedente com água destilada e a lamínula foi removida do poço e secada com papel absorvente. Finalmente, uma gota pequena de Entelan foi disposta sobre uma lâmina de vidro limpa, no qual foi colocada a lamínula. Após as lâminas secarem foi realizada a análise em microscópio óptico.

Resultados e Discussão

Para padronização da técnica de imunocitoquímica foram realizados diferentes ajustes no protocolo inicialmente proposto, até que fosse obtida a metodologia final descrita, que apresentou uma boa marcação visualizada ao microscópio óptico, sem a presença de interferentes. Ainda, várias concentrações do anticorpo primário foram testadas, até a obtenção de marcação ideal. Inicialmente as concentrações testadas foram de 1:50, 1:100 e 1:150, e foi observado uma marcação muito forte nas duas linhagens celulares estudadas (MDA-MB-231 e MCF-7). Sendo assim, concluímos que as concentrações do anticorpo estavam muito altas, de modo que novos experimentos foram realizados utilizando maiores diluições deste. Além disso, experimentos utilizando a linhagem celular MCF-10A foram realizados, a fim de avaliar a marcação da MMP-9 em células não tumorais de mama. Desta forma, o anticorpo primário foi testado em maiores diluições (1:300 e 1:500), em ambas linhagens celulares tumorais e não tumoral de mama. A partir daí, foi observado que a marcação foi mais específica para as células. Assim, a concentração do anticorpo primário de 1:300, foi escolhida para padronização da técnica, pois foi a que apresentou melhor coloração com maior especificidade.

Na concentração padronizada para o anticorpo primário (1:300), ambas as linhagens celulares tumorais de mama apresentaram marcação, indicando a expressão da MMP-9. Já a linhagem celular não tumoral de mama apresentou marcação fraca ou ausente. Esses resultados preliminares vão de acordo com a literatura que mostra o envolvimento das MMP em vários processos fisiológicos e patológicos, sendo poucas expressas em tecidos normais e substancialmente aumentadas na maioria das neoplasias malignas (SEMOLIN, 2015).

Conclusões

Diante dos resultados obtidos, é possível confirmar a padronização da técnica de imunocitoquímica no laboratório de Citologia Clínica por meio da expressão da MMP-9, bem como verificar uma maior marcação desta enzima em ambas as linhagens celulares tumorais de mama testadas, quando comparada a linhagem não tumoral. Estudos posteriores são necessários para melhorar a compreensão da expressão da MMP-9 no CM.

Agradecimentos

À Fundação Araucária e a Universidade Estadual de Maringá pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Referências

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

DE ALMEIDA, Thayse Gomes et al. Vivência da mulher jovem com câncer de mama e mastectomizada. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 19, n. 3, p. 432-438, 2015.

DE ALMEIDA SALLES, Marcio et al. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, p. 213-222, 2009.

NAGINI, Siddavaram. Breast cancer: current molecular therapeutic targets and new players. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 152-163, 2017.

SEMOLIN, Livia Maria Souza et al. Associação entre as metaloproteinases de matriz e a expansão tumoral. **Investigação**, v. 14, n. 6, 2015.