

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Ki-67 EM CÉLULAS DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

Giordanna Chiqueto Duarte (PIBIC/UEM), Lais de Sena Marques, Lyvia Eloiza de Freitas Meireles, Natália Lourenço Mari, Márcia Edilaine Lopes Consolaro, Cristiane Suemi Shinobu Mesquita, Vânia Ramos Sela da Silva (Orientador), e-mail: vrssilva@uem.br

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

Ciências da Saúde - Farmácia

Palavras-chave: câncer de colo de útero, Ki-67, imunocitoquímica

Resumo:

As infecções pelo *Papillomavirus* humano (HPV) de alto risco carcinogênico (AR) estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento do câncer de colo de útero, mas na maioria das vezes são transitórias. Porém, em algumas situações, podem ser persistentes, resultando no aparecimento de lesões intraepiteliais escamosas cervicais, que podem evoluir para o carcinoma invasor. A proteína nuclear Ki-67 é considerada um marcador de proliferação celular, uma vez que é observado um aumento de sua expressão com a progressão do ciclo celular, e então, poderia auxiliar no reconhecimento de casos com maior probabilidade de evolução. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da proteína Ki-67 em diferentes linhagens celulares derivadas de câncer de colo de útero através da técnica de imunocitoquímica. Para isso, foram utilizadas as linhagens HeLa, SiHa, CaSki e C33A e a concentração do anticorpo primário anti-Ki-67 de 1:1500. Todas as linhagens celulares tumorais de colo uterino apresentaram marcação, indicando expressão da Ki-67. Porém, a linhagem celular CasKi foi a que mostrou menor positividade. Estudos complementares são necessários para melhorar a compreensão do perfil, bem como da diferença de expressão dessa proteína entre as diferentes linhagens avaliadas.

Introdução

O câncer de colo de útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e o terceiro mais incidente na população feminina do Brasil, quando não considerado o câncer de pele não melanoma. O principal fator para o seu desenvolvimento é a infecção persistente pelo *Papillomavirus* humano (HPV) de alto risco, sendo os tipos 16 e 18 os principais responsáveis pela doença. As infecções pelo HPV na maioria das vezes são transitórias, mas em algumas situações, podem ser

persistentes, resultando no aparecimento de lesões intraepiteliais escamosas cervicais, que podem evoluir para o carcinoma invasor (BRIANTI et al., 2017). Neste sentido, o estudo de biomarcadores tem sido estabelecido a fim de reconhecer casos com maior probabilidade de evolução, e a proteína nuclear Ki-67, tem sido alvo destes estudos, pois está presente nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas ausente nas células de repouso (fase G0), de modo que sua expressão é aumentada com a progressão do ciclo celular, podendo então ser considerado um marcador de proliferação celular (BROWN, et al. 2012).

A técnica de imunocitoquímica é uma ferramenta importante como método diagnóstico complementar do câncer, na avaliação do seu prognóstico, bem como para direcionar o tipo de tratamento, pois pode ser utilizada na detecção de biomarcadores. 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).

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão da proteína Ki-67 em diferentes linhagens celulares derivadas de câncer de colo de útero através da técnica de imunocitoquímica.

Materiais e métodos

Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens de células epiteliais cancerosas cervicais HeLa (HPV-18 positiva), SiHa (HPV-16 positiva), CaSki (HPV-16 positiva) e C33A (HPV negativa).

Reativação e manutenção das linhagens celulares

Inicialmente, foi realizada a reativação das linhagens de células epiteliais cancerosas cervicais e estas foram mantidas em meio de crescimento normal específico para cada linhagem à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ / 97,5% de ar, para a manutenção de pH próximo ao fisiológico. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiam, aproximadamente, 80% da densidade de saturação.

Técnica de imunocitoquímica para avaliação da expressão da proteína Ki-67

Para a técnica de imunocitoquímica todas as linhagens celulares foram plaqueadas utilizando meio DMEM ou DMEM/F12 10% em placas de 12 poços contendo uma lamínula 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 por 2 minutos. Foi adicionado peróxido de hidrogênio, reagente de bloqueio da peroxidase endógena, durante 10 minutos. Após, 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 *Protein Block* (Spring Bioscience), 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 anti-Ki-67 (Invitrogen, Carlsbad, USA), diluído, na concentração de 1:1500, foi adicionado e incubado *overnight* em câmara úmida. No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS. E então, aplicou-se o anticorpo secundário conjugado, o qual agiu por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas 2 vezes em tampão, sendo 3 minutos cada banho. Posteriormente, foi aplicado o *Horse radish Peroxidase (HRP)* (Advanced Biosystems), 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 3,3'-diaminobenzidina tetracloridrato (DAB) (Spring Bioscience), 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 uma gota de Entellan® foi adicionada na lâmina para que as lamínulas pudessem ser colocadas e assim, realizada a leitura em microscópio óptico. A positividade da marcação foi considerada pela observação da coloração marrom-acastanhada. Os resultados foram analisados quanto à intensidade de marcação e quantidade de células marcadas. Como controle, a técnica foi realizada em todas as linhagens celulares sem a presença do anticorpo primário.

Resultados e Discussão

Para a avaliação da expressão da proteína Ki-67 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. Ainda, inicialmente foi testada a concentração de 1:2000 do anticorpo primário, porém esta mostrou marcação muito fraca nas linhagens celulares estudadas. De modo que, experimentos com a concentração do anticorpo primário de 1:1500, apresentaram melhores resultados, com maior especificidade de reação e melhor marcação.

Na concentração padronizada para o anticorpo (1:1500), todas as linhagens celulares tumorais de colo uterino apresentaram marcação, indicando a expressão da Ki-67. Porém, enquanto as linhagens de células HeLa, SiHa e C33 apresentaram boa marcação, a linhagem celular CasKi foi a que mostrou menor positividade.

A linhagem celular HeLa é originada de neoplasia de cérvix uterina glandular humana, com genoma do HPV-18, a SiHa é de origem de neoplasia de cérvix uterina humana escamosa e contém genoma do HPV-16, a CaSki é uma linhagem celular de origem de neoplasia de cérvix uterina humana metastática, e contém cópias do genoma do HPV-16 e HPV-18 e por fim, a C33A é uma linhagem celular negativa para DNA e RNA do HPV, porém derivada de câncer cervical invasivo, o que pode estar relacionado à sua alta taxa proliferativa. Este estudo mostrou que todas as

células apresentaram expressão da proteína Ki-67, o que está de acordo com a literatura que relata que a infecção por HPV promove um aumento da proliferação celular nos tecidos infectados, de modo que tem sido associada a um aumento na expressão da Ki-67 (FERRAZ et al., 2012). Ainda, no processo neoplásico, as células mutadas perdem o controle do ciclo celular e sua taxa de proliferação é aumentada, expressando mais Ki-67 (BROWN, et al. 2012).

Conclusões

Diante dos resultados obtidos, foi possível observar expressão da proteína Ki-67 em todas as linhagens celulares humanas do câncer de colo de útero avaliadas. Estudos complementares posteriores, especialmente envolvendo metodologias quantitativas são necessários para melhorar a compreensão do perfil, bem como da diferença de expressão dessa proteína entre as diferentes linhagens.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Maringá pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto, ao Laboratório de Citologia Clínica por permitir a realização do estudo, e aos pesquisadores do laboratório por todo auxílio.

Referências

BRIANTI, P. et al. **Review of HPV-related diseases and cancers.** New Microbiologica, v. 40, n. 2, p. 80-85, 2017.

BROWN, C. A. et al. **Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs.** J. Onco., p. 1-11, 2012.

DE ALMEIDA SALLES, M. 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.

FERRAZ L.C.; SANTOS A.B.R.; DISCACCIATI M.G. **Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos.** Journal of the Health Sciences Institute, v. 30, n. 2, p.107-11, 2012

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** CA CANCER J CLIN. 2021; 0:1–41