

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CAUSADOS PELA MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE HJURP EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

LARISSA OLIVEIRA DANELUZ¹; JULIANA FERREIRA DE SOUZA²; LUIS FERNANDO MACEDO DI CRISTOFARO²; RODOLFO BORTOLOZO SERAFIM²; VALÉRIA VALENTE³

¹Universidade Federal de Pelotas – larissa.daneluz@gmail.com

² Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP - jfs.unesp@gmail.com

³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Campus de Araraquara
– valenteval@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer surge do acúmulo de alterações genéticas ou epigenéticas no DNA ao longo do tempo e tem como resultado o crescimento desordenado de células, as quais invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral mais comum e mortal e geralmente leva o paciente à morte em aproximadamente 14 meses após o diagnóstico (MEIR, VAN *et al.*, 2010). Possui baixa capacidade de metástase, porém grande capacidade de infiltração pelo tecido cerebral (MEIR, VAN *et al.*, 2010).

Uma alteração a nível molecular recentemente detectada em glioblastomas é a superexpressão da proteína HJURP (Holliday junction-recognizing protein) (VALENTE *et al.*, 2009). Observou-se também que a supressão de HJURP induz instabilidade cromossômica e senescência nas células tumorais (KATO *et al.*, 2007).

O objetivo do presente trabalho é relatar as atividades realizadas no XVIII Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular da Universidade de São Paulo - USP. Objetivou-se, portanto, avaliar a modulação dos níveis de expressão de HJURP em células de glioblastoma multiforme.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo Celular e Transfecção de células com siRNAs:

A linhagem celular utilizada foi T98G, uma linhagem de glioblastoma humano, obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil), foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (SIGMA) suplementado com 10% SFB em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Para a realização dos ensaios de silenciamento e posterior transfecção com siRNAs, as células foram cultivadas em monocamada, em microplacas de 96 poços, na concentração de 3x10³ células/poço utilizando meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium –DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas em estufa a temperatura de 37 °C, 95% umidade e 5% CO₂. Após atingirem grau desejável de confluência, foi adicionado 0,125 µL dos oligonucleotídeos (solução a 10 µM), dirigidos para o RNA de interesse ou controle de sequência aleatória, em 25 µL de meio Opti-MEM (LifeTechnologies) e a mistura homogeneizada. Em seguida, foi adicionado 0,25 µL de lipofectamina (RNAiMAX Invitrogen) em cada poço e a mistura homogeneizada novamente e deixada em repouso por 20 minutos. Após o repouso, 100 µL suspensão celular com 3X10³ células/mL foi gotejada lentamente nos poços sobre o meio contendo os complexos de lipossomos com siRNA já formados. A microplaca foi tampada, homogeneizada e incubada por 24 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O silenciamento específico da expressão de HJURP foi confirmado por Western Blot, ensaio de apoptose e morte celular por microscopia de fluorescência e

análise da viabilidade por MTT. Os níveis da proteína HJURP foram estimados através de densitometria das bandas com utilização do programa ImageJ (versão 1.38). O sinal da α -tubulina foi utilizado como normalizador.

2.3. Análise da Viabilidade por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina):

Fez-se a análise de viabilidade celular por MTT, onde a mesma foi determinada por ensaio colorimétrico baseado na redução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo] ao composto formazan, detectado em 540 nm. Portanto, incubou-se em 100 μ L de meio sem soro e 0,5mg/mL de MTT em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por duas horas. Posteriormente a isso retirou-se o meio com MTT e adicionou-se 100 μ L de isopropanol acidificado, e assim, agitou-se a placa por 2 minutos e no leitor de placas realizou-se a leitura em 570nm.

2.4. Ensaio de apoptose e morte celular por Microscopia de Fluorescência:

A avaliação da viabilidade de células silenciadas foi realizada pelo uso do reagente Hoechst (Life Technologies) e o corante Iodeto de Propídio (PI) (Life Technologies) e posteriormente analisada em Microscopia de Fluorescência com aumento de 63 vezes (Nikon Optiphot-2).

2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e Western Blot:

A quantificação da proteína HJURP na linhagem silenciada foi realizada por Western Blot. Inicialmente as amostras protéicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com tampão TBS (1X, 0,25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado a temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente na presença de anticorpos anti HJURP (ABCAM, ab100800) diluídos adequadamente, e posteriormente os anticorpos secundários. Por fim, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes e exposta a filme autorradiográfico.

2.5. Localização subcelular de HJURP através de imunomarcação e aquisição de imagens por microscopia confocal

Foi realizado o plaqueamento de 10³ células/poço em placas de 96 poços. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 2% por 10 minutos. Em seguida, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,3% por 10 minutos. Logo após foi realizado o bloqueio, utilizando-se uma solução de BSA 1%. Após o bloqueio, o anticorpo primário anti-HJURP (ABCAM, ab175577) foi colocado em contato com as células (1:300) e também BSA 1% e faloidina (1:500) por uma hora. Em seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS 1X e incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:200), BSA 1% e incubação com DAPI (0,0524 μ g/mL) para marcação do núcleo, também por 1 hora. Após a incubação foi realizada novas lavagens com PBS 1X. Em seguida, as imagens foram adquiridas através de microscopia confocal com aumento de 1800 vezes (Leica SP5). Os níveis da proteína HJURP foram estimados através de densitometria das bandas da figura 3 com utilização do programa ImageJ (versão 1.38). O sinal da α -tubulina foi utilizado como normalizador.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da Viabilidade por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina):

Conforme demonstra a Figura 1, o teste do MTT mostrou redução progressiva da atividade mitocondrial em *siHJURP*, de 80-90%.

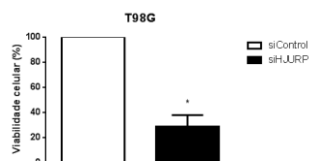


Figura 1: Viabilidade celular para a linhagem T98G através do ensaio MTT.

3.2. Ensaio de apoptose e morte celular por Microscopia de Fluorescência:

A Figura 2 mostra a microscopia de fluorescência do ensaio de apoptose, indicando um alto número de células em apoptose após silenciamento de HJURP na linhagem tumoral T98G, enquanto que no grupo controle (siC) não houveram significativas aferições de apoptose celular.

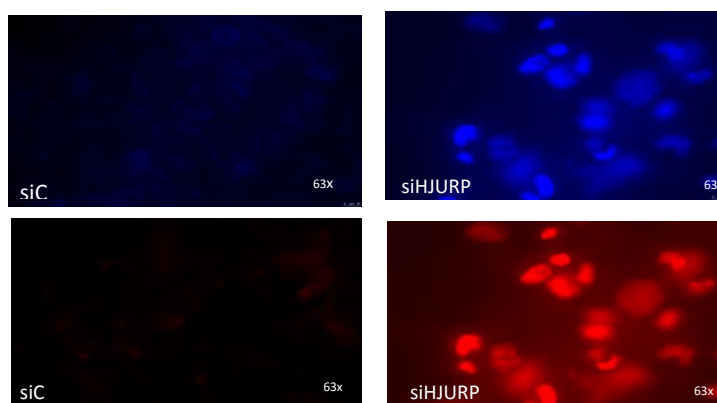


Figura 2: Microscopia de Fluorescência Linhagem T98G. SiC = controle de transfecção; siHJURP= HJURP silenciada. Corante PI (fluorescência vermelha em células apoptóticas); Corante Hoescht (fluorescência azul).

Estes resultados corroboram com um artigo publicado na revista PlosONE (VALENTE, V et al., 2013). Viu-se que no quinto dia após a redução de HJURP o nível de apoptose das células T98G aumentou significativamente, culminando num aumento brusco no índice de morte celular efetiva no sétimo dia após a transfecção.

3.3. Western Blot e quantificação da expressão de HJURP na Linha T98G:

Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sugerem o silenciamento da proteína (Figura 3).



Figura 3: SDS-PAGE 20% do silenciamento da proteína. ST= sem transfecção, SiC = controle de transfecção, siHJ₁ e siHJ₂ = HJURP.

Por análises de western blot pelo software ImageJ, observou-se uma redução significativa nos níveis de HJURP após transfecção das células da linhagem T98G, conforme mostra a Figura 4 abaixo.

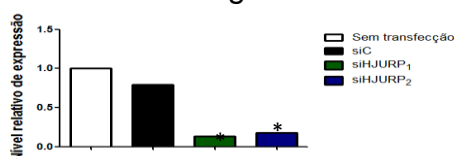


Figura 4: Níveis relativos de expressão de HJURP na linhagem T98G. SiC= controle de transfecção; siHJURP₁ e siHJURP₂= linhagem T98G silenciada.

3.4. Localização subcelular de HJURP na linhagem tumoral T98G:

Analizou-se o padrão de localização subcelular de HJURP nas células T98G cultivadas em condições padrão. Foi observada localização citoplasmática de HJURP (Figura 5), enquanto que, após o tratamento com radiação ionizante, conforme trabalho anteriormente publicado (VALENTE *et al.*, 2009), HJURP foi detectada no núcleo das células. Estes dados revelam que HJURP é recrutada para o núcleo de maneira regulada durante a resposta à presença de danos no DNA.

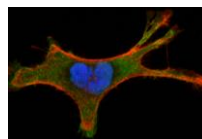


Figura 5: Imunocitoquímica da linhagem tumoral T98G realizada em Microscopia Confocal. Imunomarcagem com anticorpo anti-HJURP (verde) e coloração com DAPI (azul).

4. CONCLUSÕES

Através de experimentos de silenciamento de HJURP (transfecção com siRNAs) em células de GBM em cultura (linhagem T98G), demonstramos que uma redução de cerca de 80-90% nos níveis de expressão desta proteína ocasiona uma marcante parada no ciclo celular, resultando em apoptose das células. De qualquer modo, serão necessárias novas análises envolvendo sincronização de ciclo celular e avaliação do dano de DNA especificamente na fase S, onde o processo de reparo através de recombinação homóloga é predominante, para finalmente concluir se HJURP participa efetivamente do reparo de quebras de dupla fita de DNA. Portanto, surge como potencial de alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para gliomas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KATO, T.; SATO, N.; HAYAMA, S. et al. Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. **Cancer research**, v. 67, n. 18, p. 8544-53, 15 set 2007.

MEIR, E. G. VAN.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D. et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-93, 2010.

VALENTE, V.; SERAFIM, R. B.; DE OLIVEIRA, L. C.; ADORNI, F. S. et al. Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival. **PLOS One**, 25 abr 2013.

VALENTE, V.; TEIXEIRA, S. A.; NEDER, L. et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC molecular biology**, v.10, p. 17, jan 2009.