



Avaliação do efeito do ácido gálico no comportamento fenotípico de células de carcinoma epidermóide de boca

Hanna Thaynara Alves Teixeira Magalhães, Talita Antunes Guimarães, Eliane Macedo Sobrinho Santos, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Lucyana Conceição Farias, Ludmilla Regina de Souza, André Luis Sena Guimarães

Introdução

O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço, tendo origem nos queratinócitos do epitélio pavimentoso da cavidade bucal; representa aproximadamente 90% dos cânceres de boca. A estimativa mundial apontou aproximadamente 300 mil casos novos e 145 mil óbitos, no ano de 2012, por câncer de boca e lábio [1]. O carcinoma epidermóide de boca (CEB) é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo devido a sua alta mortalidade e frequente mutilação [1]. Atualmente, a taxa de sobrevivência em 1 (um) ano é de aproximadamente 81% e, em 5 (cinco) anos, é em torno de 50% [2]; essa frequência reduz consideravelmente em indivíduos que apresentam metástase [3].

Devido à alta morbidade causada pelo CEB, estudos têm buscado novos fármacos antineoplásicos, que possuam uma maior eficiência em induzir à morte células tumorais, e com redução dos efeitos adversos.

Neste estudo utilizou-se o ácido gálico como composto a ser investigada a sua ação sobre o CEB; este composto trata-se de um composto fenólico derivado do metabolismo secundário de plantas do cerrado brasileiro [4].

Estudos recentes têm demonstrado que o ácido gálico e seus alquil ésteres induzem a apoptose, apresentando efeito citotóxico e antiproliferativo distinto entre diferentes linhagens de células tumorais [5]

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do ácido gálico em células de carcinoma epidermóide de boca sob condições de normóxia e hipóxia tumoral.

Material e métodos

A. Cultura de células

Foram utilizadas células imortalizadas de carcinoma epidermóide de língua (SCC-9; ATCC, USA); como grupo de comparação utilizou-se queratinócitos humanos imortalizados (Hacat; ATCC, USA) cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM F12/DMEM; Lifetechnologies, USA), acrescido de 1% de antibiótico e 10% de soro bovino fetal (Lifetechnologies, USA), mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO₂.

B. Tratamento com Ácido Gálico

As células foram tratadas com 10 µg/mL de Ácido Gálico (AG) (Sigma ®) e 50mM cloreto de cobalto (CoCl₂). O CoCl₂ mimetiza a condição de hipóxia tumoral. O AG foi diluído em etanol 100%. Foi realizada uma curva dose-reposta para verificar a concentração e tempo de tratamento ideal com o AG.

Os grupos foram categorizados em: Grupo de comparação (células sem tratamento); Grupo veículo (células sem tratamento com veículo de diluição do AG); Grupo Tratado com AG, células tratadas com a concentração definida de 10 µg/mL de AG; Grupo Tratado com CoCl₂, células tratadas com 50mM CoCl₂ e por último o Grupo associação, as células tratadas com ambos 10 µg/mL e 50mM CoCl₂

C. Ensaio de proliferação celular

No ensaio de proliferação celular foram testadas diferentes concentrações do Ácido Gálico. No grupo controle foi utilizado somente o veículo. Os experimentos foram repetidos 2 vezes e realizados em triplicata. As células foram incubadas em estufa apropriada, durante 24, 48 e 72 h. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas da placa usando uma solução de tripsina, e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer. Em cada tempo experimental, foi também calculada a taxa de viabilidade celular.



D. Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular *in vitro* (modelo wound healing) [6] consiste num método de avaliação semiquantitativo. As células neoplásicas e as células do grupo de comparação foram cultivadas em placas de 12 poços contendo 1mL de meio de cultura, 1% de antibiótico e 10% de soro fetal bovino. Após a cultura se tornar confluenta, foi realizada uma “ferida” na monocamada de células, com o auxílio de uma ponteira pressionada contra o assoalho da placa de cultura, formando uma fenda na camada de células. Em seguida, a cultura foi lavada três vezes com tampão PBS para a retirada completa de debris celulares. O processo foi fotografado digitalmente em microscópio invertido em aumento de 4X. As imagens fotográficas foram capturadas no início do experimento (tempo de 0 hora) e após a incubação das células a 37°C em atmosfera umedecida com 5% CO₂ por 24 horas. A área das fendas foi mensurada nas imagens atribuindo-se 100% no tempo de 0 hora. A média das distâncias totais das áreas das fendas foram calculadas e, em seguida, atribuídos valores percentuais relativos às taxas de migração, em relação ao controle.

E. Ensaio de invasão

Para o ensaio de invasão utilizou-se o câmaras bipartites do tipo Transwell, contudo, uma membrana de policarbonato com poros de 8 µm de diâmetro. A câmara superior foi coberta por Matrigel, mimetizando a membrana basal. As células SCC9 tratadas e não tratadas com o AG foram tripsinizadas e ressuspendidas em número de 3 x 10⁵ células/ml. Foi adicionado o meio DMEM/F12 sem soro, em cada poço. Essas células foram colocadas na câmara superior de migração. A placa multipoço foi coberta e incubada por 24 horas a 37 °C na estufa de CO₂ para que ocorresse a digestão do Matrigel e invasão das células da câmara superior para inferior. As células foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS, coradas com solução de Giemsa. As imagens foram adquiridas em aumento final de 500x para determinação do número de células que invadiram o matrigel; foi realizada contagem dessas células. Cada experimento foi realizado em triplicata.

F. Análise dos dados

Todos os dados coletados foram digitalizados no programa de estatística SPSS®, versão 18.0, e posteriormente submetidos a tratamentos estatísticos específicos. Foram feitos os cálculos da média e do erro padrão para cada experimento foi utilizando a análise de variância ANOVA one-way e o teste de Tukey.

Resultados

A. Ensaio de proliferação celular, migração celular e invasão celular

O grupo tratado com o AG foi capaz de inibir a proliferação celular, a migração e a invasão das células SCC9 e SCC4 na concentração de 10 µg/mL quando comparados com o grupo controle e o grupo controle veículo. Este resultado foi avaliado no tempo de 24 hrs (Figura 1; Figura 2a-b; figura 3). Esta inibição ocorreu independente das condições de hipóxia ou normóxia.

Discussão

Estudos demonstram que o AG apresenta forte ação antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica e antitumoral [7, 8]. Com relação à atividade antitumoral, o ácido gálico tem demonstrado também atividade citotóxica seletiva, afetando principalmente células tumorais [5, 9]. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com muitos outros trabalhos que utilizam outras linhagens celulares, mostrando que mesmo em outras linhagens ocorre uma diminuição da proliferação, migração e invasão celular [10].

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Ainda há um número limitado de estudos que avaliam do ácido gálico no carcinoma epidermóide na região de cabeça e pescoço, sendo necessários estudos posteriores que possam aprofundar os conhecimentos sobre o efeito antitumoral desse composto, principalmente no que diz respeito às vias de sinalização que possam levar à modulação de mediadores inflamatórios. Neste estudo foi demonstrado que o AG foi capaz de alterar o comportamento fenotípico das SCC9, resultando em uma redução da proliferação, migração e invasão celular.



Referências

1. Chan GG, Tai BC, Liang S, Lim DT, Soo KC. Squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC)--multi-modality treatment and impact on survival. Asian journal of surgery / Asian Surgical Association. 2002 Jan;25(1):35-40.
2. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. Current opinion in oncology. 2009 May;21(3):194-200.
3. Jeremic B, Milicic B. Pretreatment prognostic factors influencing distant metastasis-free survival in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiation therapy with or without concurrent chemotherapy. American journal of clinical oncology. 2009 Oct;32(5):483-7.
4. Forgo I, Buchi J. [Synthesis, physical-chemical properties and antioxidative effect of some gallic acid esters. 2. Synthesis, purity test and quantitative determination]. Pharmaceutica acta Helvetiae. 1970 Feb;45(2):227-36.
5. Serrano A, Palacios C, Roy G, Cespon C, Villar ML, Nocito M, et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. Archives of biochemistry and biophysics. 1998 Feb 1;350(1):49-54.
6. Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. BMC biotechnology. 2004 Sep 9;4:21.
7. Gichner T, Pospisil F, Veleminsky J, Volkeova V, Volke J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. Folia microbiologica. 1987;32(1):55-62.
8. van der Heijden CA, Janssen PJ, Strik JJ. Toxicology of gallates: a review and evaluation. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 1986 Oct-Nov;24(10-11):1067-70.
9. Yoshioka K, Kataoka T, Hayashi T, Hasegawa M, Ishi Y, Hibasami H. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. Oncology reports. 2000 Nov-Dec;7(6):1221-3.
10. Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: molecular rival of cancer. Environmental toxicology and pharmacology. 2013 May;35(3):473-85.

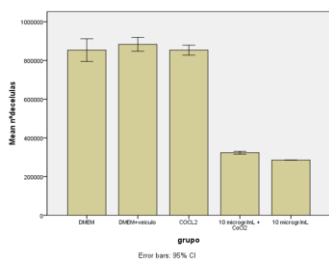


Figura 1: Ensaio de proliferação celular realizado nas células SCC9 tratadas e não tratadas. Grupo 1 controle, Grupo 2 tratado com CoCl2, Grupo 3 tratado com AG, Grupo 4 tratado com AG e CoCl2

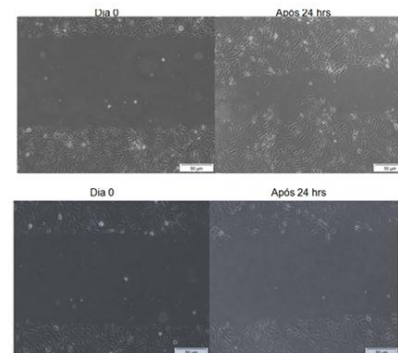
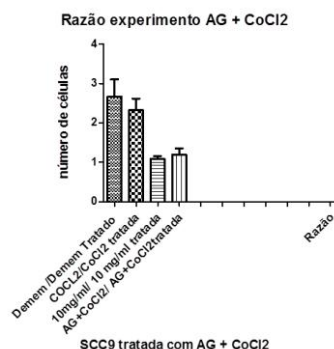


Figura 2: a. Ensaio de migração razão entre células antes do tratamento e após 24 hrs de tratamento
b. Antes e depois Grupo controle e Grupo tratado com AG

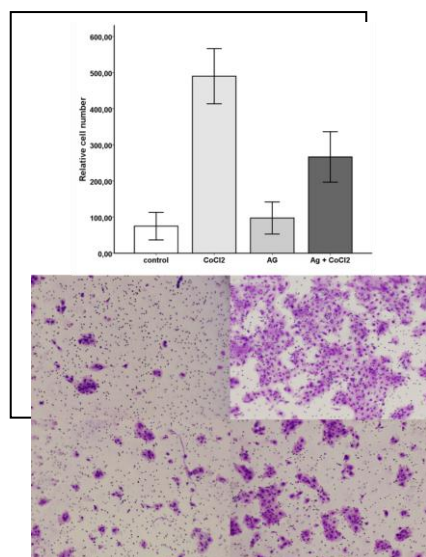


Figura 3: Ensaio de invasão celular realizado nas células SCC9 tratadas e não tratadas. Grupo 1 controle, Grupo 2 tratado com CoCl2, Grupo 3 tratado com AG, Grupo 4 tratado com AG e CoCl2