



Avaliação do efeito do ácido gálico na expressão da e-caderina em células de carcinoma epidermóide de boca

Lindsey Michelle Antunes Santos, Talita Antunes Guimarães, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Eliane Macedo Sobrinho Santos, Lucyana Conceição Farias, Ludmilla Regina de Souza, Andre Luíz Sena Guimarães

Introdução

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço, tendo origem nos queratinócitos do epitélio pavimentoso da cavidade bucal e 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]. CCEB é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo devido a sua alta mortalidade e frequente mutilação [2]. Atualmente, a taxa de sobrevida em 1 (um) ano é de aproximadamente 81% e, em 5 (cinco) anos, é em torno de 50% [3]. Sendo que, este percentual decai bastante em pacientes com metástase [4].

A molécula de E-caderina, está expressa em células epiteliais estando freqüentemente alterada em tumores e a sua expressão nas células está correlacionada com aumento da motilidade, invasão e formação de metástases, sugerindo que a N-caderina potencialize a interação entre as células tumorais e as células do estroma. Estudos revelaram que esta molécula está freqüentemente inativada durante o desenvolvimento de carcinomas humanos, incluindo carcinomas de mama, cólon, próstata, estômago, fígado, esôfago, pele, rim e pulmão [5]. Devido à alta morbidade do CCEB, pesquisadores têm buscado novos fármacos antineoplásicos, que possuam uma maior eficiência em induzir à morte células tumorais, e com poucos ou insignificantes efeitos adversos, neste estudo utilizou-se o ácido gálico, são compostos fenólicos derivados do metabolismo secundário de plantas [6].

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 [7] Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do ácido gálico na expressão da e-caderina em células de carcinoma epidermóide de boca tratadas com ácido gálico sob condições de normóxia e hipóxia.

Material e métodos

A. Cultura de células

Foram utilizadas células imortalizadas de carcinoma epidermóide de língua (SCC-9), como controle utilizou-se queratinócitos imortalizados (Hacat) cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM F12/DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 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 (Sigma ®) e 50mM cloreto de cobalto (CoCl₂). O ácido gálico foi diluído em etanol puro. O tratamento foi realizado por 24 hrs. Os grupos foram divididos em: Grupo Controle, células sem tratamento; Grupo Tratado com AG, células tratadas com 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. Extração de RNA e conversão para cDNA

A extração de RNA das células foi realizada com o reagente TRIZOL (Invitrogen), segundo instruções do fabricante com algumas modificações. Na etapa inicial, foi adicionado 200µl de clorofórmio e agitando vigorosamente com as mãos por 15 segundos, seguindo de uma incubação à temperatura ambiente por mais 10 minutos. Centrifugou-se a 10.400 rpm por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubos limpos após centrifugação e acrescentou-se



500µl de álcool isopropílico, deixando os tubos incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Após os 10 minutos, centrifugou-se a 10400 rpm por 10 minutos, a 4°C, e removido o sobrenadante, deixando apenas o pellet que foi lavado com 1ml de etanol a 75% . Centrifugou-se esse material a 8600 rpm, por 5 minutos a 4°C. No final do procedimento, o sobrenadante foi descartado e o pellet colocado a uma temperatura ambiente por 10 minutos para secar. O mesmo foi ressuscitado em 20µl de água DEPC (Dietilpirocarbonato), e aquecido a 55°C por 10 minutos. Após a extração verificou-se a integridade do RNA realizando o gel de agarose, as amostras integras foram então convertidas a cDNA.

D. Reação de Transcrição Reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com o Kit SuperScript III First-Strand™ cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando: 2µl de RNA extraído, 2µl do primer reverso, 1µl do dNTP mix (10mM) e 10µl de água DEPC, finalizando um volume de 15µl. Esse mix foi aquecido a 65°C por 5 minutos e colocado no gelo por 1 minuto. Uma mistura contendo 2µl do Buffer (10x), 4µl de MgCl₂ (25mM), 2µl de ditioneitol DTT (0,1 M), 1µl de RNase out (40U/µl) e 1µl da enzima transcriptase reversa SuperScript III RT (200U/µl) foi preparada e adicionada à primeira mistura contendo o RNA. Os tubos foram incubado a 50°C por 50 minutos e posteriormente a reação foi inativada a 85°C por 5 minutos. Após breve centrifugação, foi adicionado 1µl de RNase H em cada tudo por 20 minutos a 37°C para remoção do RNA molde da molécula cDNA:RNA. O DNA complementar (cDNA) sintetizado foi armazenado a -20°C até o momento de sua utilização.

E. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A expressão do genes na cultura de células foi avaliada através doPCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Para isso, foi realizado, previamente, a extração do RNA total e sua conversão em DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa. Para as reações de amplificação em tempo real foi utilizado o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), contendo a molécula fluorescente e os demais reagentes necessários à amplificação. Primers específicos do gene de estudo foram baseados em estudos prévios da literatura ou desenhados confecção através do software Primer Express. Foi adotado o método da quantificação relativa para avaliar os níveis de transcrição dos genes estudados. Esse método consiste na comparação dos Cts (Threshold cycle) de cada amostra em relação a um gene endógeno e a uma amostra calibradora, sendo os resultados apresentados em ordem de grandeza.

F. Análise dos dados

Todos os dados coletados serão digitalizados no programa de estatística SPSS®, versão 18.0, para Windows® e posteriormente submetidos a tratamentos estatísticos específicos.

Resultados

A. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Após 24 horas de tratamento as células foram tripsinizadas o RNA foi extraído, verificou-se sua integridade, realizou se a transcrição e avaliou se a expressão das SCC9 e da Haca1.

Verificou se que a expressão da E-caderina aumentou tanto em condições de normoxia e de hipóxia. E nas células utilizadas como controle, Haca1, não ocorreu expressão do Col1.

Discussão

Vários estudos demonstram que o AG apresenta forte ação antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica e antitumoral [8]. Com relação à atividade antitumoral, o ácido gálico tem demonstrado também atividade citotóxica seletiva, afetando principalmente células tumorais e não as linhagens celulares normais [7, 9]. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com muitos outros trabalhos que utilizam outras linhagens celulares [10]. O aumento na expressão de E-caderina resulta em uma diminuição da proliferação e inibição de invasão e metástases, já a sua inibição em células de carcinoma contribuem para a ocorrência de eventos da carcinogênese, incluindo a perda do controle sobre o crescimento e proliferação celular, podendo também facilitar a invasão tumoral, esta inibição pode ocorrer por



FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:
Unimontes
Universidade Estadual de Montes Claros

APOIO:
FAPEMIG
FADENOR

24 a 27 setembro
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

diversos mecanismos, dentre estes mecanismos encontra-se os eventos epigenéticos e a hipermetilação do gene E-caderina, tem sido associada à redução de sua expressão em diferentes carcinomas [5].

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Ainda há um número limitado de estudos que avaliam do ácido gálico no CCECP, 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.

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. Firman R, Heiselman D, Lloyd T, Mardesich P. Pneumoscrotum. *Annals of emergency medicine*. 1993 Aug;22(8):1353-6.
3. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current opinion in oncology*. 2009 May;21(3):194-200.
4. 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.
5. Kwak JM, Min BW, Lee JH, Choi JS, Lee SI, Park SS, et al. The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 2007 Nov;50(11):1873-80.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
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.

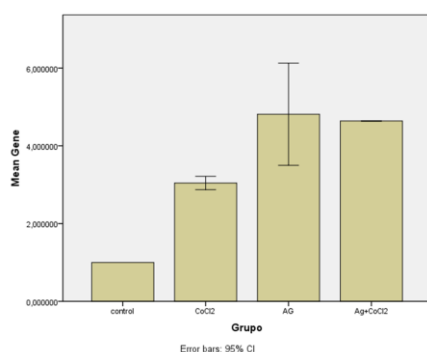




Figura 1. Expressão da E-caderina na SCC9 nos diferentes grupos, Grupo Controle; Grupo Tratado com CoCl_2 , Grupo tratado com AG e Grupo tratado com AG e CoCl_2