



## Avaliação do efeito do ácido gálico sobre a expressão do Colágeno I em células de carcinoma epidermóide de boca

Débora Regina Fagundes Durães, Talita Antunes Guimarães, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Lucyana Conceição Farias, Ludmilla Regina de Souza, Alfredo Maurício Batista de Paula, 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. Atualmente, a taxa de sobrevivência em 1 (um) ano é de aproximadamente 81% e, em 5 (cinco) anos, é em torno de 50%; essa frequência reduz consideravelmente em indivíduos que apresentam metástases [2].

O Col I é uma das proteínas estruturais mais abundantes no tecido conjuntivo, sendo sua expressão gênica afetada em diferentes tipos de neoplasias [3]. Para que ocorra a migração de células tumorais pelas matrizes extracelulares do organismo é necessário que haja um arcabouço de matriz extracelular. Durante o crescimento neoplásico, pode ocorrer um aumento na deposição de colágeno, principalmente dos tipos I e III, o que caracteriza a reação desmoplástica do estroma [4].

Devido à alta morbidade causada pelo CEB, estudos têm buscado novos fármacos antineoplásicos, que possuam uma maior eficiência em induzir à morte células tumorais, com efeitos adversos reduzidos. 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 [5].

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 [6]. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do ácido gálico sobre a expressão do colágeno tipo I (Col1A1) 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 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 CO<sub>2</sub>.

#### B. Tratamento com Ácido Gálico

As células foram tratadas com 10 µg/mL de Ácido Gálico (AG) (Sigma ®) e 50mM cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>). O CoCl<sub>2</sub> 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 CoCl<sub>2</sub>, células tratadas com 50mM CoCl<sub>2</sub> e por último o Grupo associação, as células tratadas com ambos 10 µg/mL e 50mM CoCl<sub>2</sub>.



### C. *Extração de RNA e Transcrição reversa*

A extração de RNA das células foi realizada com o reagente *TRIZOL*<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA), segundo instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria e a pureza considerada foi de 1,8 a 2,0 (leitura 260/280). Em seguida, foi verificada sua integridade através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo a brometo de etídio. A identificação de duas bandas distintas representa o RNA ribossomal (28S e 18S), confirmando a integridade do RNA (Figura1). O RNA extraído foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando a enzima transcriptase reversa (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA).

### D. *PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)*

A expressão dos gene *Col1A1* nas linhagens celulares foi avaliada através do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Para as reações de amplificação em tempo real foi utilizado o reagente SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), contendo a molécula fluorescente e os demais reagentes necessários à amplificação. Os primers utilizados para essas técnicas correspondem aos primers específicos para o cDNA dos genes de interesse. A confecção e verificação dos parâmetros dos primers foram realizadas através do software Primer Express. A análise dos pares de bases foram executadas através do software BLASTN, a fim de confirmar o anelamento e similaridade com outros genes. As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata, e os primers forward e reverse avaliados, previamente, quanto a eficiência de amplificação, afim de garantir a confiabilidade dos resultados. Foi adotado o método da quantificação relativa para avaliar os níveis de transcrição do gene estudado [7]. Esse método consiste na comparação dos Cts (Threshold cycle: ciclo de amplificação acima do limiar) de cada amostra em relação a um gene endógeno e a uma amostra calibradora, sendo os resultados apresentados em ordem de grandeza.

### E. *Análise dos dados*

Todos os dados coletados foram digitalizados no programa de estatística SPSS<sup>®</sup>, 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. *PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)*

Verificou-se que a expressão do *Col1* foi diminuída tanto em condições de normoxia e de hipóxia. E nas células utilizadas como controle, HacaT, não ocorreu expressão do *Col1A1* (Figura 2).

## **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[6, 9]. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com diversos trabalhos que mostram que o colágeno do tipo I está presente em nas lesões de CEB [10]. Acredita se que o colágeno seja um importante gene envolvido na carcinogênese de boca, e sua diminuição possa auxiliar no processo de metástase. E o ácido gálico foi capaz de promover a diminuição do colágeno, mostrando com isso sua possível atividade antineoplásica[8]

## **Conclusão/Conclusões/Considerações finais**

Ainda há um número limitado de estudos que avaliam o efeito do ácido gálico no carcinoma epidermóide na região de cabeça e pescoço, sendo necessários estudos funcionais que possam aprofundar os conhecimentos sobre o efeito antineoplásico desse composto, principalmente no que diz respeito às vias de sinalização que possam levar à modulação de mediadores envolvidos no processo de carcinogênese. Neste estudo observou-se que ácido gálico desempenha uma importante função na expressão do *Col1A1*, podendo com isso ser um importante composto para o tratamento do CEB.



## 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. 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.
3. Yamamoto M, Sumiyoshi H, Nakagami K, Taniyama K, Tahara E. Distribution of collagen types I and III and basal lamina in human gastric carcinoma: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1984;403(4):313-22.
4. Nurmenniemi S, Koivula MK, Nyberg P, Tervahartiala T, Sorsa T, Mattila PS, et al. Type I and III collagen degradation products in serum predict patient survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2012 Feb;48(2):136-40.
5. 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.
6. 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.
7. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
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.

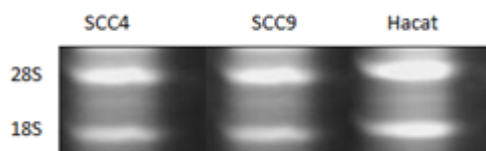


Figura 1. Gel de agarose 1% ilustrando a integridade dos RNA nas linhagens SCC4, SCC9 (carcinoma epidermóide de boca) e HACAT (queratinócito humano normal). As bandas 18S e 28S correspondem às subunidades do RNA ribossomal.

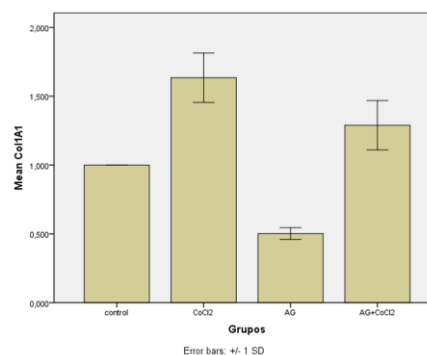


Figura 2. Expressão do Col1 na SCC9 nos diferentes grupos, Grupo Controle; Grupo Tratado com CoCl<sub>2</sub>, Grupo tratado com AG e Grupo tratado com AG e CoCl<sub>2</sub>