

ÁCIDO GÁLICO POTENCIALIZA O EFEITO TERAPÊUTICO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

Autores: ROGÉRIO GONÇALVES DA ROCHA, ELIANE MACEDO SOBRINHO SANTOS, TAYSLA BARBOSA MOREIRA, KARINA MARINI DE AGUIAR, SABRINA FERREIRA DE JESUS, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

Introdução

A carcinogênese de boca é um processo complexo, onde se evidencia a ocorrência de inúmeras alterações genéticas e epigenéticas, que possibilitam a transformação de células biologicamente normais em células funcionalmente alteradas, no que se refere a disregulações da proliferação celular e invasividade nos tecidos adjacentes (NEVILLE; DAY, 2002; RODENHISER; MANN, 2006). A radioterapia (RT) é uma importante modalidade terapêutica adjuvante para o tratamento do carcinoma epidermóide de boca (CEB) (VIKRAM, 1998). Apesar dos avanços nesta modalidade de tratamento, os tumores podem recorrer dentro do campo irradiado, devido à baixa responsividade das células, levando a um prognóstico ruim (HIRO *et al.*, 2008). Por isso, é crucial a realização de pesquisas com foco no desenvolvimento de tratamentos complementares para aumentar a eficácia terapêutica da radiação ionizante. Atualmente, há um substancial interesse no potencial terapêutico de extratos de plantas brasileiras, especialmente com ação em neoplasias. O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, AG), um fenol de ocorrência natural em plantas, pode inibir o desenvolvimento de neoplasias através de vários mecanismos, tais como a inibição da metástase (KIM *et al.*, 2006; OHNO; INOUE; OGIHARA, 2001; GUIMARAES, T.A. *et al.*, 2016). No carcinoma epidermóide de boca (CEB), o real efeito do AG não é bem esclarecido. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo avaliar o potencial da ação do AG, sobre o fenótipo de linhagens de carcinoma de células escamosas, submetidas à radiação ionizante.

Material e métodos

A. Cultivo celular, tratamento com AG e exposição à radiação ionizante

As linhagens de células imortalizadas de CEB, SCC-9 e SCC-4 (ATCC, USA), foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 contendo 10% de soro fetal bovino, 400ng/ml de hidrocortisona e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco, USA). As células foram tratadas com 10µg/ml de AG (Sigma, USA), por 72 horas. A exposição das células à radiação ionizante foi realizada no dia da administração da última dose de AG, através da exposição das células em semiconfluência, com dose de 6 Gy de cobalto-60 (gray: unidade internacional de dose de radiação ionizante), utilizando-se o equipamento Telecobalto Theratron Phoenix Philips SR 7510 (Eindhoven, Holanda), a uma distância fonte-campo de 70cm.

B. Determinação do efeito da radiação e/ou AG na proliferação celular

Na avaliação do comportamento fenotípico, proliferação celular, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer, utilizando o método de azul de tripan. O número de células por mL foi obtido pela equação:

$$N^{\circ} \text{ de células/ml} = (N^{\circ} \text{ total de células} / N^{\circ} \text{ de quadrantes contados}) \times \text{fator de diluição} \times 10.000.$$

Os dados de proliferação foram obtidos 72 horas após a exposição das células à radiação, totalizando 144h após o início experimental. Posteriormente, foi avaliado o índice de sobrevivência (IS) foi calculado de acordo com a equação a seguir: $IS = (N^{\circ} \text{ total de células irradiadas} / N^{\circ} \text{ total de células não irradiadas}) \times 100$

C. Ensaio de morte celular

Após os tratamentos experimentais, as células foram coradas com brometo de etídio (BE) e alaranjado de acridina (AA) (Sigma Aldrich, USA). BE emite fluorescência vermelha evidenciando células mortas; AA emite fluorescência verde em células viáveis (KASIBHATLA *et al.*, 2006)

D. Análises estatísticas

Os resultados foram tabulados e analisados no software estatístico SPSS®, versão 18.0, para Windows. Foi utilizado o teste Anova One-Way, com nível de significância $p < 0,05$.

Resultados e discussão

A. Ácido gálico altera comportamento proliferativo de células de CEB submetidas à irradiação ionizante

A Fig. 1A apresenta o comportamento proliferativo das células SCC-9 tratadas e não tratadas com AG, após a exposição à uma dose de 6GY de radiação ionizante. As células do grupo controle irradiado sofreram diminuição nos níveis de proliferação, devido aos danos imediatos e tardios provocados pela radiação no DNA das células. O AG atuou reduzindo os níveis de proliferação celular como pode ser verificado na comparação do grupo controle e grupo tratado com AG sem presença da radiação ionizante. Os efeitos da radiação ionizante, reduzindo a proliferação celular, foi potencializado pela ação do AG. O número de células foi menor no grupo tratado com AG e irradiado quando comparado ao grupo controle irradiado e ao grupo tratado com AG não irradiado (Fig. 1A).



Os dados de índice de sobrevivência das células do “grupo controle não tratado com AG” e do “grupo tratado com AG” depois das células terem sido irradiadas estão apresentados na Fig. 1B. Confirmando os dados da contagem celular, os resultados mostraram que o AG pode prejudicar sobremaneira a sobrevivência das células neoplásicas, quando estas são submetidas à radiação ionizante, potencializando, assim, os efeitos provocados pela radiação. As células neoplásicas SCC-9 tratadas com AG apresentaram uma diminuição de 20,3% no índice de sobrevivência (Fig. 1B).

B. O Ácido gálico potencializa a morte celular induzida pela radiação ionizante

O AG promoveu um aumento importante do número de morte de células de CEB, especialmente quando o tratamento das células com o AG foi realizado concomitantemente à exposição à radiação ionizante. Tais resultados apontam para um efeito sinérgico da AG, potencializando sobremaneira a morte celular induzida pela radiação (Fig. 2). Estudo recente demonstrou o efeito antineoplásico do AG em linhagens de CEB; no entanto, sua ação aliada à terapêutica para a doença não foi investigada na literatura (GUIMARAES, T.A. *et al.*, 2016). Os resultados desse estudo foram pioneiros ao demonstrar um efeito terapêutico potencializador do AG sobre a radiação ionizante em células de CEB.

Considerações Finais

O AG promoveu uma redução importante nos níveis de proliferação e aumento da morte de células de CEB, podendo potencializar sobremaneira o efeito terapêutico da radioterapia, e levando a uma considerável redução da população de células neoplásicas de boca. Análises experimentais de modelos de estudo *in vivo* necessitam ser realizados a fim de corroborar tais resultados.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brasil. Os autores também agradecem à Universidade Estadual de Montes Claros.

Referências bibliográficas

- NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*, v. 52, n. 4, p. 195-215, Jul-Aug 2002.
- RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, v. 174, n. 3, p. 341-8, Jan 31 2006.
- VIKRAM, B. Adjuvant therapy in the head and neck cancer. *CA Cancer J Clin*, United States, v.48, n.4, p.199-209, 1998.
- KIM, S. H. *et al.* Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci*, v. 91, n. 1, p. 123-31, May 2006.
- OHNO, T.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Cytotoxic activity of gallic acid against liver metastasis of mastocytoma cells P-815. *Anticancer Res*, v. 21, n. 6A, p. 3875-80, Nov-Dec 2001.
- GUIMARAES, T.A. *et al.* Evaluation of the antineoplastic activity of gallic acid in oral squamous cell carcinoma under hypoxic conditions. *Anticancer Drugs*, v.27, n.5, p.407-416, 2016.
- KASIBHATLA, S. *et al.* Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *CSH Protoc*, v. 2006, n. 3, Aug 01 2006.

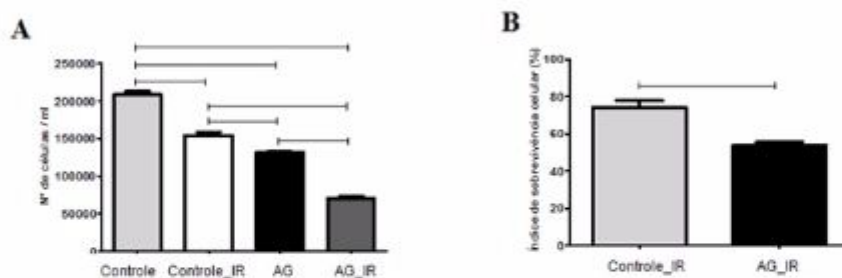


Figura 1. (A) Alterações na proliferação de células SCC-9 após o tratamento, com 10µg/ml de AG e administração de dose de 6GY de radiação ionizante. **(B)** Índice de sobrevivência das células SCC-9 tratadas com 10µg/ml de AG e grupo controle não tratado, ambos os grupos sob irradiação com 6 Gy de cobalto. Barras horizontais indicam $p < 0,05$ entre os grupos; Teste Anova One-Way. Controle: grupo controle não irradiado; Controle_IR: grupo controle irradiado; AG: grupo tratado com AG e não irradiado; AG_IR: grupo tratado com AG e irradiado.

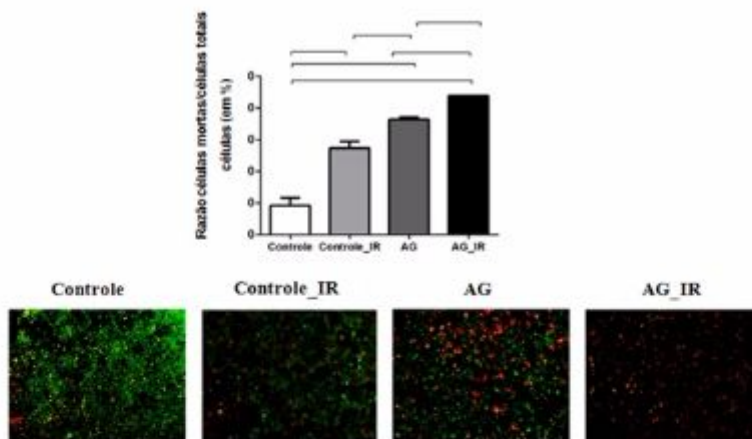


Figura 2. Ensaio de morte celular. Células SCC9 foram tratadas com 10µg/ml de AG e expostas à 6Gy de radiação ionizante. AG potencializou significativamente a morte celular induzida pela radiação. Barras horizontais indicam $p < 0,05$ entre os grupos; Teste Anova One-Way. Controle: grupo controle não irradiado; Controle_IR: grupo controle irradiado; AG: grupo tratado com AG e não irradiado; AG_IR: grupo tratado com AG e irradiado. Fluorescência verde indica células vivas; fluorescência vermelha indica células mortas.