

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO ÁCIDO GÁLICO NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAIS EM CONDIÇÕES HIPÓXICAS, UMA ABORDAGEM BIOINFORMÁTICA

**Autores:** LORENA BARBOSA COSTA, AMANDA DIAS SILVA ANDRADE, MARCELA GONÇALVES DE SOUZA, SABRINA FERREIRA DE JESUS, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, CARLOS ÍCARO DE JESUS SILVA, LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS,

### Introdução

O câncer bucal é identificado como uma ameaça significativa para a saúde pública em todo o mundo. Além disso, seu tratamento geralmente provoca disfunção e mudanças na fala, mastigação, interação social e até morte (SPEKSNIJDER *et al.*, 2010). O carcinoma de células escamosas bucais (CCEB) é a neoplasia maligna mais comum que ocorre na boca, no entanto, nas últimas décadas, a taxa de sobrevivência de pacientes com CCEB não obteve melhora significativa (SHAW *et al.*, 2000). Estudos têm mostrado os efeitos de vários genes que exibem o potencial metastático de CCEB e tentam esclarecer o mecanismo molecular da patogênese do CCEB (FRAGA *et al.*, 2012).

O CCEB é uma neoplasia maligna localmente agressiva com progressão rápida e redução da concentração de oxigênio (RYU *et al.*, 2010). Sugeriu-se que a natureza invasiva e metastática do CCEB é consequência de sua adaptação ao microambiente hipóxico (UEHARA *et al.*, 2009). Um mecanismo importante para a adaptação às concentrações reduzidas de oxigênio é a regulação do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1?) (SEMENZA *et al.*, 2006). HIF-1? medeia respostas adaptativas em níveis celulares e sistêmicos para a manutenção da homeostase e é o principal mecanismo pelo qual as células tumorais respondem a acidose e estresse hipóxico. O ácido gálico (AG) foi sugerido para induzir a apoptose e desempenhar um papel primordial na prevenção do câncer (FARIED *et al.*, 2007). No entanto, o mecanismo molecular relacionado ao efeito do AG em metástases permanece obscuro. Considerando estes fatos, o objetivo do presente estudo é desenvolver e testar um modelo teórico que possa explicar o mecanismo de ação do AG no CCEB pela primeira vez.

### Material e métodos

#### A. Design de estudo

O modelo teórico foi realizado utilizando bioinformática e análise de redes de interação.

#### B. Bioinformática e análise de redes de interação

A abordagem do gene líder foi realizada como foi descrito anteriormente e modificado (POSWAR *et al.*, 2015). Resumidamente, o CCEB, o ácido gálico e a hipóxia como palavras-chave foram utilizados, iniciando a pesquisa em PubMed, Gene-Bank e Genecards. Apenas experimentos com um alto grau de confiança (0,9-0,99) foram considerados. Após a definição dos genes candidatos em relação ao CCEB e AG, a lista foi expandida usando o software disponível na Web STRING (versão 9.05). De acordo com o número ponderado de links (WNL), os genes foram agrupados, usando K-means. Genes sem interações eram genes órfãos. A análise topológica foi realizada com Cytoscape e FANMOD, enquanto a análise ontológica foi realizada com BinGO.

#### C. Análise estatística

As análises foram realizadas usando o software SPSS (Versão 18.0) e GraphPad Prism (Versão 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram avaliados por ANOVA unidirecional, seguido do teste pós-teste de Tukey. Todos os dados são dados como médias  $\pm$  S.D. O significado estatístico foi aceito em  $p < 0,05$ .

### Resultados e discussão



## A. Redes de bioinformática e interação

A metástase é uma causa de morte para a maioria dos pacientes com câncer e depende de várias etapas, incluindo a formação de vasos, adesão celular, migração, invasão e proliferação celular. Esses eventos são regulados por mecanismos complexos. Um baixo microambiente de oxigênio é um dos fatores responsáveis pela indução de metástase em vários tumores sólidos (FRAGA *et al.*, 2012). Para avaliar o possível papel do AG em células cancerosas sob condição hipóxica, foi realizada uma abordagem bioinformática considerando interações de proteínas humanas. Usando AG, hipóxia e câncer como palavras-chave preliminares, os genecards sugeriram 12 genes que obtiveram pontuação superior a 0,70. Os 12 genes sugeridos em genecards foram expandidos no software STRING. A rede tinha 45 genes (Fig. 1A). A rede exibe um comportamento de lei de poder (correlação: 0.919; R2: 0.867 Fig. 1B) de acordo com a teoria livre de escala da bionetwork. Os genes líderes foram ubiquitina C (UBC) e inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (CDKN1A) (Figura 1C).

Sob a tensão normal de oxigênio, o HIF-1 $\alpha$  é degradado pela proteólise dependente da ubiquitina. Angiogênese, metabolismo glicolítico, sobrevivência celular e invasão são regulados pelo HIF-1 $\alpha$ ; esta proteína atua como um fator acelerador na progressão tumoral e metástase (FRAGA *et al.*, 2012). Além disso, os fatores genéticos e epigenéticos associados ao CDKN1A, que foi um dos genes líderes, têm sido associados a níveis de CDKN1A de várias neoplasias (MOREIRA *et al.*, 2009).

Estudos anteriores relataram que a AG desempenha um papel importante na prevenção da transformação maligna e do desenvolvimento de neoplasias (SEMENZA *et al.*, 2006). O presente estudo mostrou que AG possui fortes propriedades anticancerígenas; investigamos os efeitos da AG sobre invasão / migração / proliferação de células do CCEB. A análise ontológica demonstrou que o ciclo celular, a proteólise e o metabolismo das proteínas são os principais processos biológicos associados ao tratamento com AG. (Fig. 1D). Estes dados sugerem que o AG pode reduzir a proliferação de células de câncer humano em condições hipóxicas, além de indicarem que o AG é capaz de inibir as capacidades invasivas e migratórias in vitro, bem como a inibição da proliferação celular.

## Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Em conclusão, a bioinformática apresentou uma rede de 45 genes a qual os genes líderes foram a ubiquitina e o CDKN1A. Então, o presente estudo associou o ciclo celular, a proteólise e o metabolismo das proteínas ao tratamento com o AG, que possui fortes propriedades anticancerígenas, como os efeitos redutivos sobre invasão / migração / proliferação de células do CCEB.

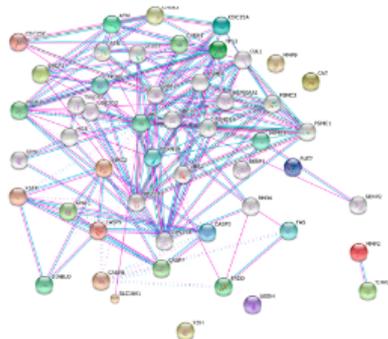
## Agradecimentos

Este estudo foi apoiado por subvenções do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr. Guimarães, Dr. Colleta, Dr. Santos e Dr. de Paula que são Pesquisadores do CNPq.

## Referências bibliográficas

- Fariied, A., *et al.* Anticancer effects of gallic acid isolated from indonesian herbal medicine, phaleria macrocarpa (scheff.) boerl, on human cancer cell lines. *International journal of oncology* 2007; 30:605-613.
- Fraga, C. A., *et al.* A high hif-1 $\alpha$  expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral oncology* 2012; 48:130-135.
- Moreira, P. R., *et al.* Methylation of p16, p21, p27, rb1 and p53 genes in odontogenic keratocysts. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2009;38:99-103.
- Poswar, F. de O. *et al.* Bioinformatics, interaction network analysis, and neural networks to characterize gene expression of radicular cyst and periapical granuloma. *Journal of endodontics* 2015;41:877-883.
- Ryu, M. H., *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of  $\alpha$ 5 integrin and fibronectin. *Biochemical and biophysical research communications* 2010;393:11-15.
- Semenza, G. L., *et al.* Regulation of gene expression by hif-1. *Novartis Foundation symposium* 2006; 272:2-8; discussão 8-14, 33-16.
- Shaw, R. J. *et al.* Contemporary clinical management of oral squamous cell carcinoma. *Periodontology* 2000 2011; 57:89-101.
- Speksnijder, C. M., *et al.* Oral function after oncological intervention in the oral cavity: A retrospective study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2010; 68:1231-1237.
- Uehara, M., *et al.* Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  in oral squamous cell carcinoma and its relation to prognosis. *Oral oncology* 2009; 45:241-246.

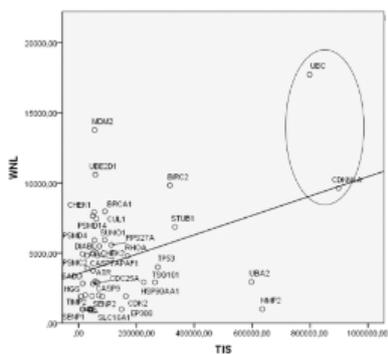
A



B



C



D

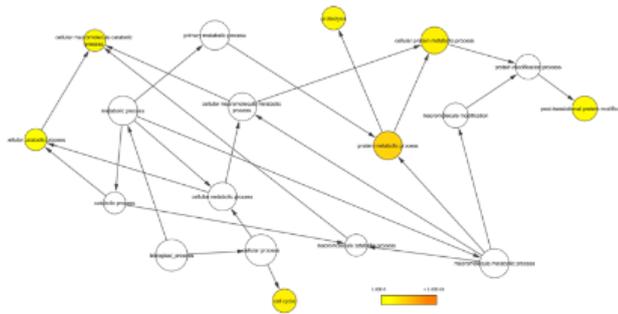


Figura 1.

Análises de Bioinformática: Fig. 1A, Resultados STRING para o CCEB; Fig. 1B, Comportamento de lei de poder; Fig. 1C, Genes líder; Fig. 1D, Análises odontológicas do AG.