

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO ÁCIDO GÁLICO NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAIS EM CONDIÇÕES HIPÓXICAS

Autores: LORENA BARBOSA COSTA, AMANDA DIAS SILVA ANDRADE, CARLOS ÍCARO DE JESUS SILVA, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, JÚLIA AQUINO DE MORAIS, MARCELA GONÇALVES DE SOUZA, SABRINA FERREIRA DE JESUS,

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 e possui uma potente capacidade de metástase local e distante (KUROKAWA *et al.*, 2005). As células neoplásicas na frente invasiva frequentemente perdem fenótipos das células epiteliais e adotam fenótipos semelhantes a células mesenquimais, referentes à transição epitelial-mesenquimatosa (TEM). A degradação do colágeno tipo 1A1 (Col1A1) e redução ou perda da expressão da E-caderina é considerada uma marca registrada da TEM (ZHENG *et al.*, 2009).

Sugeriu-se que a natureza invasiva e metastática do CCEB é uma 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 hipoxia 1-alfa (HIF-1 α) (SEMENZA *et al.*, 2006). A superexpressão do HIF-1 α tem sido observada em muitas neoplasias humanas e o aumento dos níveis de proteína HIF-1 α correlaciona-se com estágios avançados de doença e prognóstico ruim (KUNG *et al.*, 2000). Evidências recentes sugerem que as vias de TEM e hipóxia podem estar associadas ao desenvolvimento de metástases (TSENG *et al.*, 2015). O ácido gálico (AG) foi sugerido para induzir a apoptose e desempenhar um papel primordial na prevenção da neoplasia (FARIED *et al.*, 2007). No entanto, o mecanismo molecular relacionado ao efeito da AG em metástases permanece obscuro. Considerando esses fatos, o objetivo do presente estudo é desenvolver e testar um modelo que possa explicar o mecanismo de ação da AG em CCEB pela primeira vez.

Material e métodos

A. Isolamento de RNA e PCR em tempo real

O RNA foi isolado de células usando o reagente de Trizol (GIBCO Invitrogen), de acordo com o fabricante.

O RNA total foi transcrito de forma reversa e o cDNA subsequente foi aquecido a 95 ° C para terminar a reação. Para o PCR em tempo real, foram adicionados 2 μ l do cDNA ao reagente SYBR GREEN (Life) com o HIF-1 α , Col1A1, E-caderina e caspase-3 (Sun *et al.*, 2014) iniciador específico / conjunto de sondas (Life technologies, carlsbad, CA, EUA); A amplificação foi realizada em um sistema StepOne Real-Time PCR (Life technologies, carlsbad, CA, EUA). Todas as reações foram realizadas em triplicado e Beta-Actin (Life technologies, carlsbad, CA, EUA) serviu como controle interno.

B. Ensaio de proliferação

As células SCC-9, SCC-4 e HaCaT (1 X 10⁵) foram semeadas em uma placa de 16 poços suplementada com 10% de FBS. Em seguida, AG (Sigma) e CoCl₂ (Sigma) foram adicionados ao meio de cultura. Após 24 h, as células dos 5 grupos foram tripsinizadas e contadas usando uma câmara de Neubauer.

C. Ensaio de migração

A migração celular foi monitorada em um ensaio de raspagem de ferida como descrito anteriormente (BRUSEVOLD *et al.*, 2012). Resumidamente, um arranhão foi feito com uma ponta de pipeta estéril em uma camada celular confluyente, e depois adicionou-se 10 μ g / ml de AG e 100 μ M / mL de CoCl₂ em meio isento de soro. Os poços foram fotografados no início do experimento e após 24h (células SCC-9 / HaCaT). Imagens foram obtidas pela câmera SC30 (Olympus, Center Valley, PA, EUA) em um microscópio invertido IX81 (Olympus, Center Valley, PA, EUA). O software ImageJ foi utilizado para análise

D. 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 obtidos como médias \pm S.D. O significado estatístico foi aceito em p <0,05.

Resultados e discussão

A. AG reduz a migração do carcinoma de células escamoso bucal sob condições hipóxicas

Os experimentos mostraram que o AG diminuiu o número de células HaCaT (Fig. 1 A) e SCC-9 (Fig. 1 B) sob condições de hipóxia. Os ensaios de invasão de feridas foram realizados nas células CCEB. Em comparação com o grupo não tratado, nas células SCC9 (Fig. 2), o fechamento da distância gap foi inibido significativamente por AG a 10 μ g / ml nas células HaCaT e SCC-9 (Fig. 2A e B). Conforme mostrado na Fig. 2C, AG reduziu significativamente a invasividade e a migração em grupos CoCl2 + AG em células SCC9 (Fig. 2C). Os resultados indicaram que o AG é capaz de inibir as capacidades invasivas e migratórias in vitro, bem como a proliferação celular.

B. Efeito de AG em HIF-1 β , Caspase-3, E-caderina e expressão de Col1A1

A hipóxia é observada pelos níveis mais elevados de HIF-1 β com a adição de CoCl2 em comparação com o grupo controle de células HaCaT (Fig. 3 A). AG diminuiu os níveis de HIF-1 β em células HaCaT sob condições hipóxicas (Fig. 3 A). Por outro lado, os níveis de HIF-1 β foram maiores em células SCC-9 tratadas com AG e CoCl2 em comparação com AG sozinho e o grupo controle (Fig. 3B). Além disso, verificamos os níveis de proteína HIF-1 β em células SCC9 e observamos que AG + CoCl2 reduziu os níveis de HIF-1 β na hipóxia, mas aumentou os níveis de HIF-1 β na normóxia (Fig. 3B). Nossos dados demonstram que AG, sob condições hipóxicas, está associado à diminuição da expressão da proteína HIF-1 β .

Nossos dados indicaram que o tratamento de AG acende acentuadamente a transcrição de caspase-3. O AG + CoCl2 aumentou a transcrição de caspase-3 quando comparado aos controles em células HaCaT, mas, AG não demonstrou efeito nos níveis de mRNA de caspase-3 em células sob condições hipóxicas (Fig. 3 B).

Foi demonstrado que a perda da expressão / função da E-caderina está associada ao desenvolvimento e à progressão do CCEB. A perda de E-caderina é frequentemente associada à TEM e à aquisição de um fenótipo mais invasivo e metastático (ZHENG et al., 2009). No estudo atual, AG recuperou os níveis de E-caderina em células cancerosas em condições normóxicas e hipóxicas e reprimiu Col1A1. Os grupos AG e CoCl2 + AG induziram regulação ascendente da E-caderina e supressão de Col1A1 nas células SCC9 (Fig. 3 B). Nas células HaCaT, AG e CoCl2 + AG também induziram um aumento nos níveis de RNA da E-caderina.

Conclusão

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que AG reduz significativamente a proliferação, invasão e migração celular ao aumentar a E-caderina, reprimir Col1A1 e diminuir a expressão da proteína HIF-1 β .

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 A Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr. Guimarães, Dr. Colleta, Dr. Santos e Dr. de Paula que são Pesquisadores do CNPq.

Referências bibliográficas

- Brusevold, I. J., et al. Migration induced by epidermal and hepatocyte growth factors in oral squamous carcinoma cells in vitro: Role of mek/erk, p38 and pi-3 kinase/akt. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology 2012;41:547-558.
- Fariad, 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.
- Kung, A. L., et al. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. Nature medicine 2000; 6:1335-1340.
- Kurokawa, H., et al. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology 2005; 34:329-333.
- Semenza, G. L., et al. Regulation of gene expression by hif-1. Novartis Foundation symposium 2006; 272:2-8; discussão 8-14, 33-16.

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.

Sun, T., *et al.* The synergism and mechanism of action of rclone30-hdr5 in combination with trail on hcc. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 2014; 49:985-992.

Tseng, J. C., *et al.* A twist tale of cancer metastasis and tumor angiogenesis. *Histology and histopathology* 2015;30:1283-1294.

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.

Zheng, G., *et al.* Disruption of e-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *The American journal of pathology* 2009; 175:580-591.

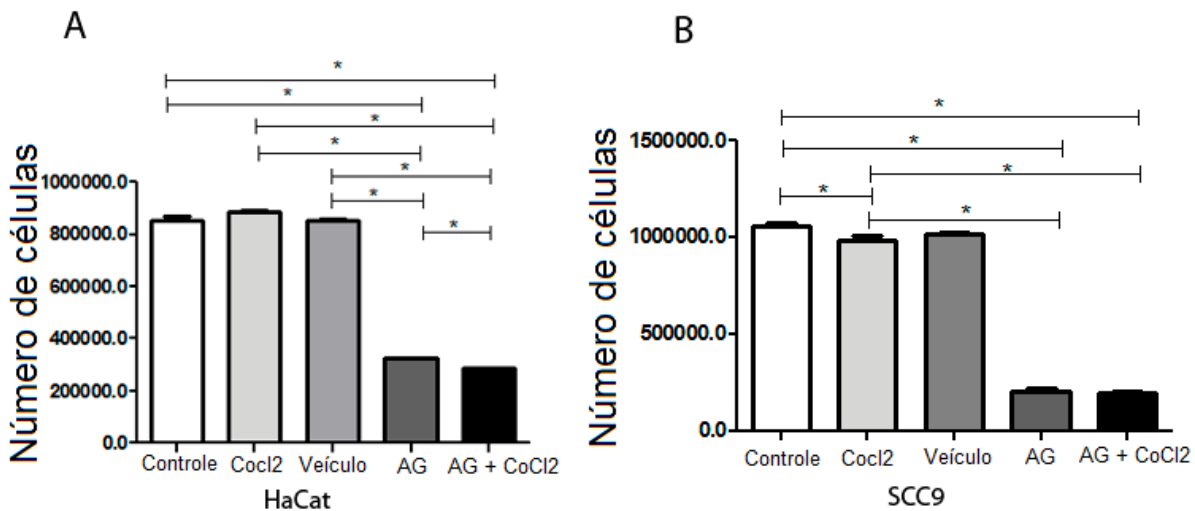


Figura 1. Efeito de AG na célula numérica sob condições normóxicas e hipóxicas em células de carcinoma Fig. 1A, Efeito de AG em número de células HaCaT; Fig. 1B, Efeito de AG em número de células SCC9. * Significado estatístico

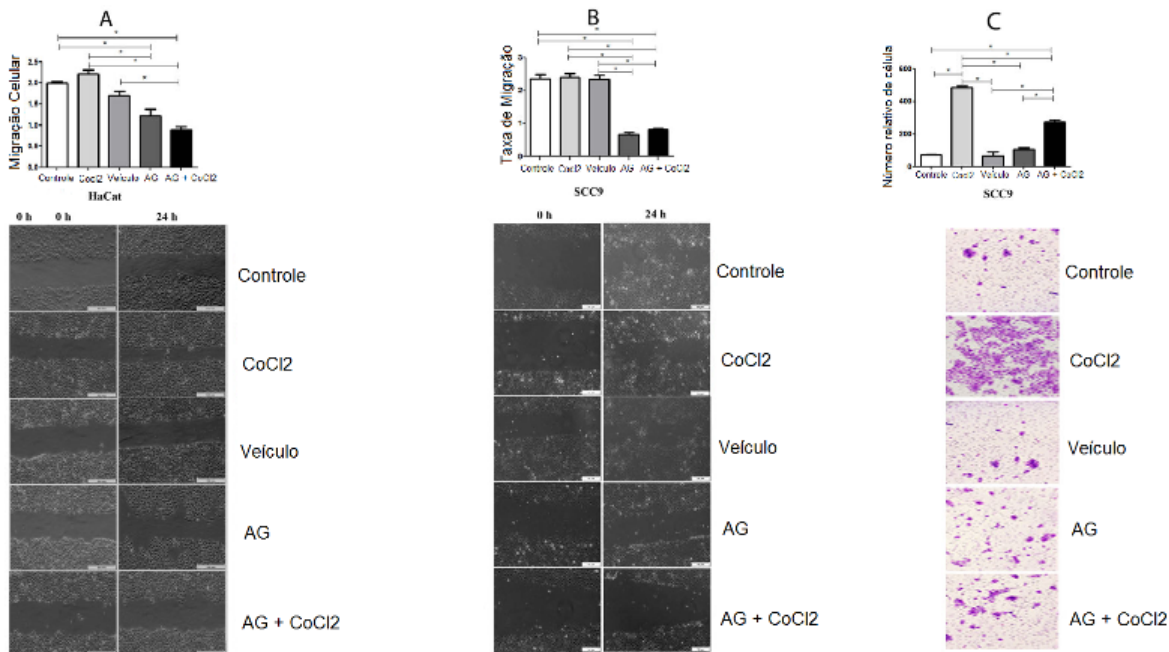
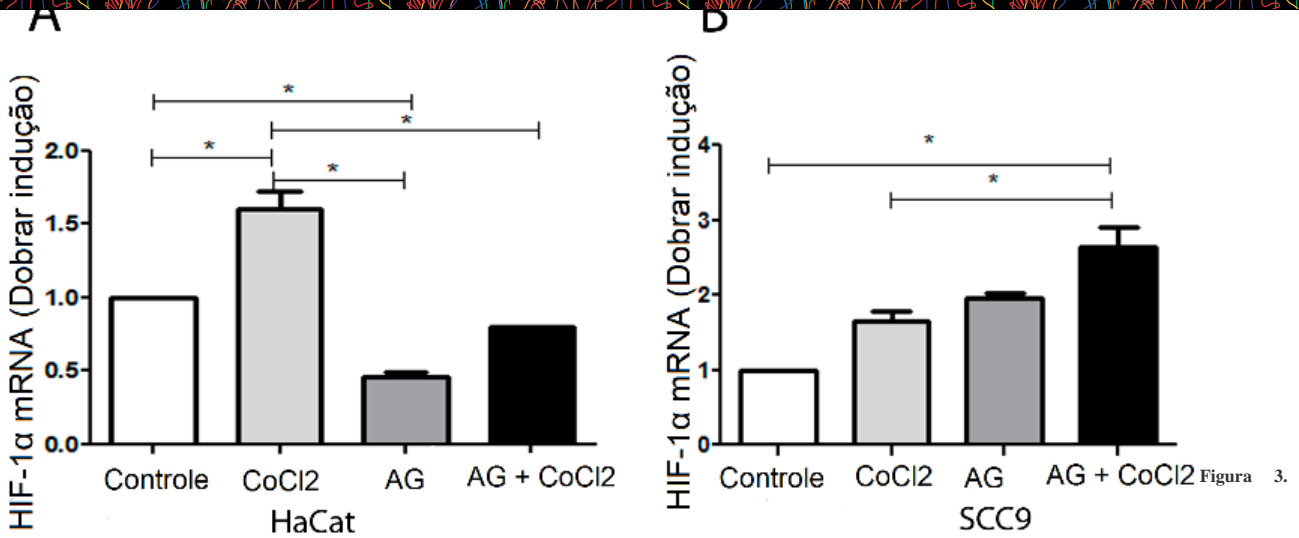


Figura 2. Efeito da AG na migração e invasão sob hipóxia em células de carcinoma. Fig. 2A, Efeito do teste de esfregaço da AG de células HaCaT; Fig. 2B, Efeito do teste de esfregaço da AG de células SCC9; Fig. 2C, Efeito do ácido gálico em ensaio Matrigel de células SCC9. * Significado estatístico



Efeito de AG em HIF-1? sob hipóxia Fig. 3A, Efeito de AG em níveis de mRNA de HIF-1? em células HaCaT; Fig. 3B, Efeito de AG em níveis de mRNA de HIF-1? em células SCC9, *Significado estatístico

Image not found or type unknown