

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): ALFREDO MAURICIO BATISTA DE PAULA, GUILHERME VELOSO RAMOS, TALITA ANTUNES GUIMARÃES, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, ELIANE MACEDO SOBRINHO SANTOS, GERALDO ACLÉCIO MELO, LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

Ácido gálico modula o comportamento e expressão gênica de células do carcinoma epidemóide de boca por interferir na via de sinalização da leptina

Introdução

A leptina (lep) é um componente da regulação da homeostase energética corporal. Evidências sugerem um papel importante da Lep nos mecanismos da carcinogênese em diversos tipos de neoplasias (DIEUDONNE *et al.*, 2002). A leptina age como um mediador mitogênico, anti-apoptótico, angiogênico e promotor do desenvolvimento tumoral (AMBROSINI *et al.*, 2002). Apesar da escassez de estudos, a via da lep tem emergido como um alvo importante para novas investigações terapêuticas.

Atualmente, há um substancial interesse no potencial terapêutico de extratos de plantas brasileiras, especialmente com ação em neoplasias. O ácido gálico (AG) é um composto polifenólico que tem sido apontado para interferir no comportamento de células neoplásicas, devido a sua ação antioxidante, antimutagênica (LIAO *et al.*, 2012). No carcinoma epidemóide de boca (CEB), o real efeito do AG não é bem esclarecido.

Assim, o objetivo do estudo foi investigar o potencial do AG para modular a proliferação e migração induzidas pela Lep em células de CEB, e os mecanismos moleculares relacionados. Foi também explorado o efeito do AG sobre a secreção de lep pelas células de CEB.

Material e métodos

O projeto foi aprovado pelo CEP-UNIMONTES (nº 798.341). Foram utilizadas duas linhagens celulares imortalizadas de CEB (SCC-9 e SCC-4, ATCC, USA). As células foram tratadas com 100ng/ml de Leptina (Lep) e/ou 10µg/ml de ácido gálico (AG) (Sigma Aldrich, USA), durante 72 horas. Os ensaios *in vitro* foram conduzidos sob condição de normóxia e com mimetização de hipóxia pela adição de cloreto de cobalto (CoCl₂; Sigma Aldrich), para ensaios específicos.

A. Análise in silico

Foram realizadas análises através do método Docking molecular (softwareAutodockVina®) para modelagem de interações entre AG, Lep e LepR; Análise Metacore para modelagem da ação do AG sobre a via da Lep; Plataforma STITCH para o modelo de interações entre AG e proteínas-alvo.

B. Ensaio de proliferação celular

Foi utilizado o método de quantificação celular em câmara de Neubauer. As células SCC foram estimuladas a proliferar pelo tratamento com a Lep, mimetizando uma condição de níveis aumentados de leptina. Em seguida, foram tratadas com o AG.

C. Ensaio de morte celular

Após os tratamentos, 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.

D. Ensaio de migração celular

A migração celular foi avaliada pelo ensaio de *wound-healing*. Resumidamente, faz-se uma escarificação na área de confluência celular e, após os tratamentos experimentais, verifica-se a área que as células migraram.

E. Análises de expressão gênica

Os níveis de expressão do mRNA de genes relacionados à migração celular (Col1A, MMP2, MMP9), morte celular/apoptose (Caspase-3), angiogênese (mir210 e HIF-1α) e via da Lep (LepR) foram avaliados através da técnica qRT-PCR. Também foi avaliada a expressão do mRNA de LepR e HIF1α em condições de hipóxia.



F. Análise de leptina secretada

Através do método Elisa (Kit Leptin Human ELISA-LDN®) foram mensurados os níveis de lep secretada pelas células SCC após os tratamentos experimentais.

G. Análise Imunohistoquímica

A técnica imunohistoquímica foi realizada utilizando anticorpos obR (clone H-300, sc-8325, Santa Cruz Biotechnology, USA) e p44/42 MAPK (ERK1/2) (Clone 137F5, Cell Signaling Technology, USA).

H. Análises estatísticas

Os resultados foram tabulados no *software* estatístico SPSS®, versão 18.0. Foram executados os Testes T e Anova, com nível de significância: $p < 0,05$.

Resultados e discussão

A. Análise *in silico* revela possibilidade de interação ácido gálico-sinalização da leptina

As análises *in silico* apontaram para possibilidades de interações moleculares entre AG, LEP e LepR (Fig.1A). A modelagem molecular sugere que o AG pode competir com a LEP no sítio de ligação ao seu receptor (Fig. 1B). Além disso, as análises apontaram que o AG pode inibir a enzima HSD17B2 (Fig 1C), que produz progesterona a partir do seu precursor. A progesterona, por suavez, ativa o receptor de glucocorticoids (GCR-alfa), que é responsável pela indução da expressão de LEP (RELIC *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos a partir da plataforma STITCH (Fig. 2) orientaram a escolha dos genes avaliados neste estudo. Nesta rede de interação pode-se perceber que alguns genes analisados neste trabalho, como MMP2 e MMP9, interagem com o AG. Os outros genes analisados são influenciados indiretamente pelo AG via AKT.

B. Ácido gálico interfere na proliferação celular induzida pela leptina, migração e morte de células de CEB

O tratamento das células de CEB com o AG reduziu a proliferação celular, apesar do efeito proliferativo induzido pelo tratamento das células com a Lep (Fig. 3A). O AG reduziu a migração das células neoplásicas (Fig. 3B).

Em concordância, o AG levou ao aumento da morte celular e maiores níveis de expressão de mRNA de caspase -3 comparado ao grupo tratado com a Lep (Fig. 3C). Os efeitos do AG parecem ser dominantes sobre os efeitos mediados pela leptina, uma vez que persistem também quando as células são cultivadas com a combinação de AG com LEP.

C. Ácido gálico reduziu a expressão de genes relacionados à migração celular, angiogênese e via da Leptina

O tratamento das células com o AG foi associado redução dos níveis de expressão de mRNA de genes relacionados à migração celular (Col1A, MMP2, MMP9), morte celular/apoptose (Caspase-3), angiogênese (mir210 e HIF-1 α) e via da Lep (LepR). O AG parece reduzir a expressão de HIF1a e LepR em condições de hipóxia. (Fig. 4).

D. Ácido gálico diminui a expressão de LEPR e a Leptina secretada pelas células de CEB, regulando negativamente p44/42 MAPK

O AG foi capaz de reduzir o nível de LEP secretada pelas células do CEB. Na imunohistoquímica observou-se que o tratamento com LEP aumentou a expressão de LEPR. Por outro lado AG foi capaz de reduzir a expressão da proteína LEPR e provocou uma regulação negativa na expressão do MAPK (ERK 1/2), condizendo com a redução do fenótipo proliferativo das células (Fig. 5).

Considerações finais

A inibição da proliferação e da migração, favorecida pelo AG, parece sobrepor ao efeito proliferativo induzido pela Lep. Assim, o estudo apontou um potencial inibitório do AG sobre a secreção de leptina no CEB, possivelmente, levando a uma redução na migração e proliferação neoplásica.

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

- AMBROSINI, G. *et al.* Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*, United States, v.277, n.37, p.34601-9, 2002.
- DIEUDONNE, M.N. *et al.* Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, United States, v. 293, n.1, p.622-8, 2002
- LIAO, C.L. *et al.* Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. *Food Chem Toxicol.*, United States, v. 50, n. 5, p.1734-40, 2012.
- RELIC, B. *et al.* Genistein induces adipogenesis but inhibits leptin induction in human synovial fibroblasts. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, Baltimore : Williams & Wilkins, v. 89, n. 7, p.811-22, 2009.

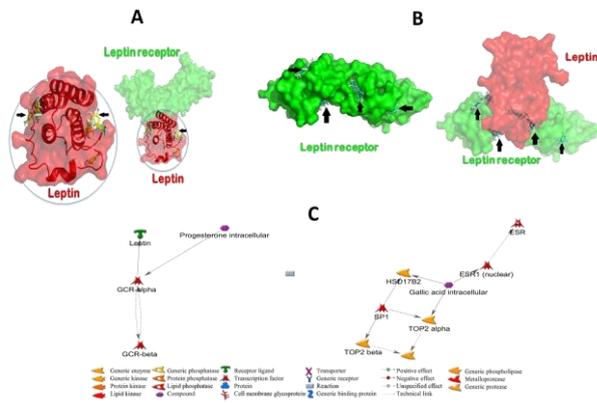


Figura 1. Modelos *in silico* de interações entre ácido gálico (AG), leptina (Lep) e receptor da leptina (LepR). (A) Interação entre AG e Lep. (B) Interação entre AG e LepR. (C) Modelo de ação do AG sobre a via da Lep. Seta preta indica a molécula de AG no sítio de ligação de

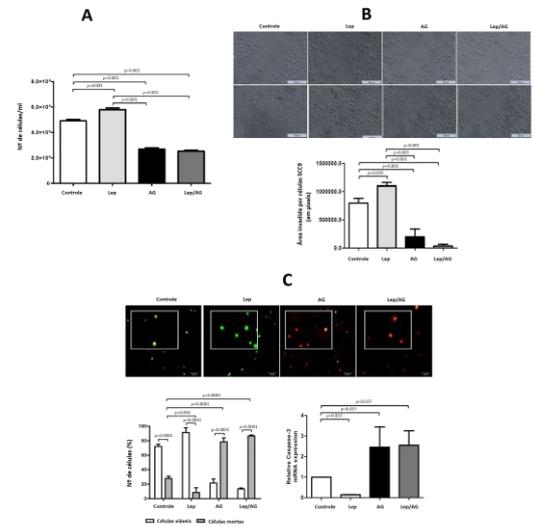


Figura 3. Efeito do ácido gálico (AG) e/ou leptina (Lep) sobre a proliferação, migração e morte de células SCC9. (A) Ensaio de proliferação celular. (B) Ensaio de migração celular. (C) Ensaio de viabilidade/morte celular e expressão relativa de mRNA de caspase-3. As células com fluorescência verde representam células viáveis; fluorescência vermelha indica células mortas.

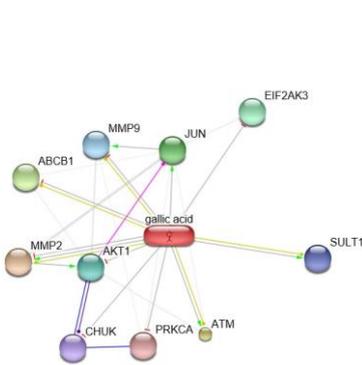


Figura 2. Rede de interações *in silico* entre ácido gálico e proteínas-alvo. Barra vermelha: "down-regulation"; Seta verde: "up-regulation"; Círculo amarelo: interação com efeito não observado.

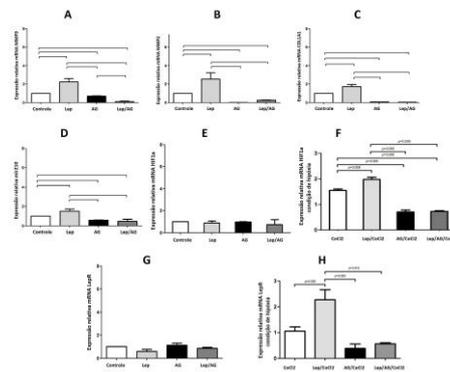


Figura 4. Alterações na expressão de mRNA de MMP9 (A), MMP2 (B), COL1A1 (C) e mir210 (D), HIF1a (E, F) e LepR (G, H) em células SCC-9 tratadas com ácido gálico (AG) e/ou leptina (Lep). A expressão de HIF1a e LepR foi analisada sob condição de normóxia e hipóxia. Barras indicam $p < 0.05$

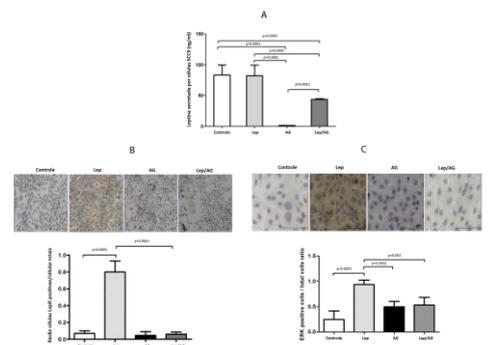


Figura 5. Alterações dos níveis de leptina secretada por células SCC9 (A), expressão imunohistoquímica de LepR (B) e ERK total (C), após tratamento com ácido gálico (AG) e/ou leptina (Lep).