

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): JOÃO VITOR DA SILVA RODRIGUES, ALFREDO MAURICIO BATISTA DE PAULA, ANA PAULA FONSECA OLIVEIRA, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, AMANDA SOUTO MACHADO, CARLOS ALBERTO DE CARVALHO FRAGA

Angiotensina 1-7 diminui a expressão de HIF-1 α em células do Carcinoma de Células Escamosas de Boca submetidos à hipóxia

Introdução

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) é responsável por 16% a 40% de todas as neoplasias malignas humanas (BAVLE *et al.*, 2016). A hipóxia é uma das condições do microambiente de tumores sólidos que podem contribuir para a progressão do tumor, nesse caso através da regulação do fator induzível pela hipóxia 1-alfa (HIF-1 α), um fator de transcrição sensível ao oxigênio (HAN *et al.*, 2016). Mecanismos patológicos de hipóxia induzidos pela expressão de HIF-1 α promovem aumento das taxas de mutação, expressão de genes associados com a angiogênese tumoral e ativação de mecanismos de invasão tecidual por células metastáticas. Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um hormônio composto de sete peptídeos que faz parte do sistema renina-angiotensina (ZHAO *et al.*, 2013). Estudos apontaram que Ang-(1-7) reduz o crescimento de células cancerosas de pulmão e próstata, com concomitante decréscimo no fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (KRISHNAN *et al.*, 2013). A diminuição do crescimento do tumor por Ang-(1-7) está associada com a proliferação celular e o comportamento metastático. Além disso, a Ang-(1-7) é um ligante endógeno para o receptor Mas, um receptor acoplado à proteína G, a qual é mediadora da transmissão de diversos tipos de sinais. As identificações do receptor Mas tem fornecido valiosas informações bioquímicas e moleculares acerca da significância biológica de Ang-(1-7) (SANTOS *et al.*, 2003). Nesse estudo, objetivou-se investigar os efeitos da administração de Ang-(1-7)-Mas sobre a expressão de HIF-1 α em uma linhagem celular de CCEB submetidas a condições de hipóxia.

Material e métodos

A. Reagentes

Os anticorpos foram adquiridos da Cell Signaling (Beverly, MA, USA): anticorpos policlonais de coelho anti- HIF-1 α e anti- β -actina (4967). Os anticorpos policlonais IgG anti-mouse e IgG anti-rabbit conjugados com peroxidase (HRP) foram comprados da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Angiotensina-(1-7) foi comprada da Bachem Americas, Inc. (Torrance, CA). HPBCD foi adquirido da CERESTAR[®] e o HPBCD-Ang-(1-7) foi preparado no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (Brasil). Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

B. Cultura de células e tratamentos

Fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) foram semeados em placas de cultura de 150 mL e mantidas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. Células MEF provenientes de animais tipo selvagem (WT), MASKO (animais *knockout* para o receptor Mas) e ACE2KO (animais *knockout* para a enzima ACE2) foram utilizados. Células OSCC-9 foram provenientes de biópsia de língua humana, cultivadas a 37°C, 5% CO₂ em meio de cultivo F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 400 ng/mL de hidrocortisona (Sigma, St. Louis, MO) e 10% de soro fetal bovino. O cultivo de células em condições de normóxia foi realizado em incubadora úmida com 5% CO₂, 95% umidade e temperatura de 37°C. Para cultura em hipóxia, as células foram incubadas com 150 μ M CoCl₂ por 24 horas e mantidas em 5% CO₂ a 37°C. Os tratamentos foram realizados com as células incubadas com 1) solução tampão PBS, 2) CoCl₂, 3) Ang-(1-7) e 4) CoCl₂ + Ang-(1-7).

C. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi utilizado para definir as concentrações de CoCl₂ adequadas para as análises das expressão proteica por western blot. Células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1 \times 10⁴ células/poço, cultivadas por 12 horas a 37°C e 5% CO₂, e tratadas com diferentes concentrações de CoCl₂ (50, 100, 150, 200 μ mol/L) por 24 h. Posteriormente, solução de MTT (50 μ g/10 μ L) foi adicionada às células e incubada por 4 horas. Em seguida, 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço após a remoção da solução de MTT. A viabilidade celular foi avaliada após medida da absorbância a 490 nm em equipamento Enzyme-labeling (EX-800 type). Todos os procedimentos foram realizados em triplicatas. A curva de crescimento das células foi realizada usando a variável tempo como abscissa e absorbância (média \pm desvio padrão) como ordenada.

D. Reações de western blot para análise da expressão proteica de HIF-1- α

Proteínas foram extraídas das células, posteriormente separadas usando géis SDS-PAGE (10%), e então transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com tampão de bloqueio Odyssey 1 \times (LICOR Biosciences, Lincoln,

10^o

FEPEG

FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Nebraska, USA). Os anticorpos primários utilizados foram HIF-1 α 115 kDa (1 : 1000), β -actin 45 kDa (1 : 1000). O anticorpo secundário foi diluído de 1:15000. Os blots foram visualizados e analisados usando o sistema de imagem Odyssey Infrared Imaging System (LICOR Biosciences).

E. Análise estatística

Todos os procedimentos estatísticos foram feitos no programa Statistical Package for the Social Science SPS 20.0 para Windows. Inicialmente os dados foram apresentados como média \pm desvio-padrão (DP). Comparações foram testadas utilizando-se o teste ANOVA. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e discussão

A expressão de HIF-1 α foi aumentada em todos os tipos celulares e tempos de tratamento investigados após a indução da condição de hipóxia com CoCl₂. Foi identificada uma diminuição da expressão proteica de HIF-1 α após incubação com Ang-(1-7) em todos os tipos celulares e períodos de tratamento. Os níveis da proteína HIF-1 α foram significativamente inferiores em MEF tratado com CoCl₂ + Ang-(1-7) quando comparadas com o tratamento CoCl₂ isolado ($p < 0,05$). Nas células MASKO (células sem o receptor Mas), nenhuma diferença foi observada na expressão da proteína HIF-1 α independente da ocorrência de hipóxia isolada ou em associação com Ang-(1-7) (Figura 1). Na linhagem OSCC-9, a expressão de HIF-1 α foi significativamente menor na condição de hipóxia incubada com Ang-(1-7) quando comparada à hipóxia isolada nos períodos de 24h e 48h. Em células OSCC-9, assim como em fibroblastos normais, a Ang-(1-7) reduziu os níveis da proteína HIF-1 α . Em concordância com resultados de outros estudos, a administração de Ang-(1-7) inibiu o principal gene envolvido no fenômeno de hipóxia, o HIF-1 α . Como o HIF-1 α medeia os efeitos biológicos da angiogênese tumoral por ativação do receptor acoplado à proteína G, o receptor Mas (SANTOS *et al.*, 2003), a administração de Ang-(1-7) pode atuar como uma molécula terapêutica para o CCEB.

Conclusões

Os resultados do presente estudo sugerem que a administração de Ang-(1-7) em células do CCEB determina uma menor expressão proteica de HIF-1 α especialmente na condição de hipóxia, num mecanismo dependente do receptor Mas.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais (Fapemig) e a coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio. Agradecemos também a Diretoria Acadêmica do Hospital Universitário Clemente de Faria (HUCF/Unimontes) pelo suporte dado a esse projeto de pesquisa.

Referências bibliográficas

- BAVLE, R. M. *et al.* Molecular Classification of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 9, 2016.
- KRISHNAN, B. *et al.* Angiotensin-(1-7) reduces proliferation and angiogenesis of human prostate cancer xenografts with a decrease in angiogenic factors and an increase in sFlt-1. **Prostate**, v. 73, n.1, p. 60-70, jan. 2013.
- SANTOS, R. A. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258-63, jul. 2003.
- ZHAO, W. *et al.* Angiotensin 1-7 Promotes Cardiac Angiogenesis Following Infarction. **Current vascular pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 37-42, 2015.

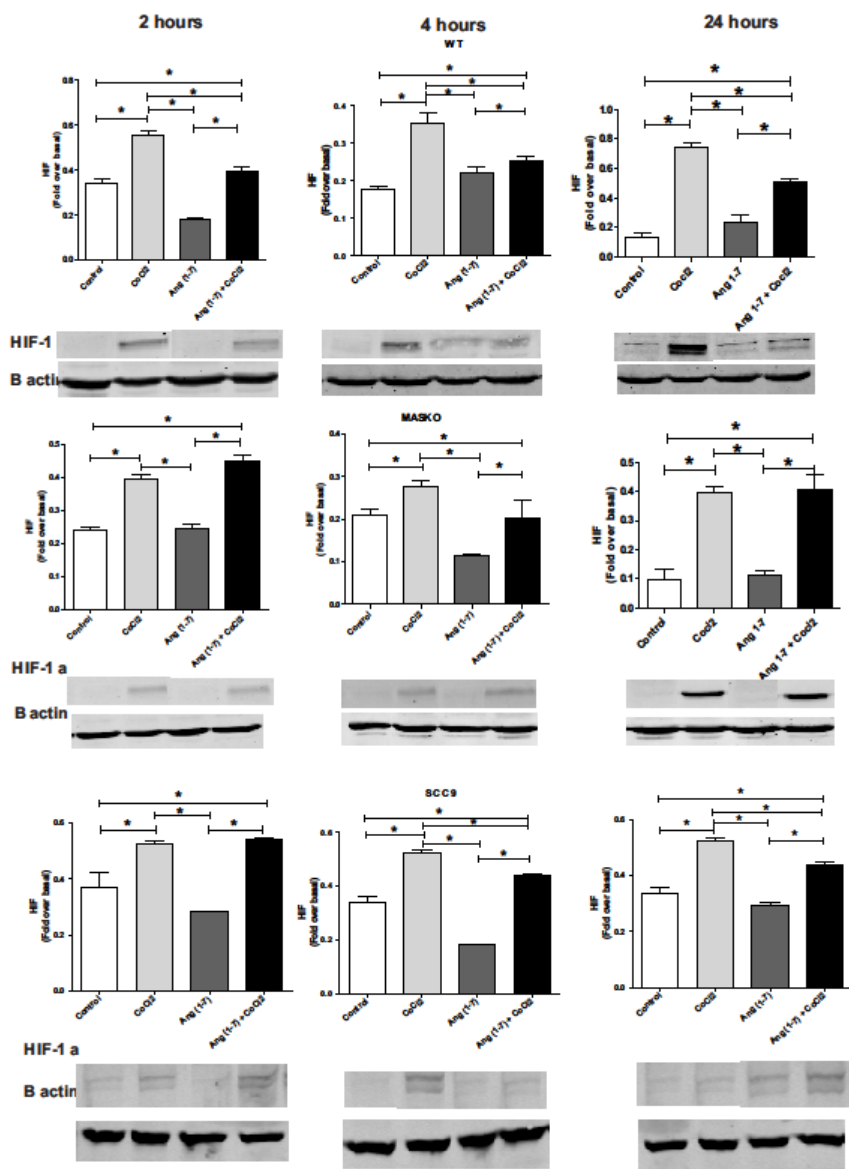


Figura 1. Expressão da proteína HIF-1 α em células MEF tipo selvagem (WT), MASKO e de Carcinoma de células escamosas bucal (OSCC-9) em condições de normóxia (controle), de hipóxia induzida com CoCl₂, tratamento com Ang-(1-7) e a combinação de Ang-(1-7) e CoCl₂. * representam p<0,05.