



## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NA EXPRESSÃO DE $\text{hif-1}\alpha$ EM CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

*Carlos Ícaro de Jesus Silva*

### **Introdução**

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço, tendo origem nos queratinócitos do epitélio pavimentoso da cavidade bucal e representa aproximadamente 90% dos cânceres de boca. A estimativa mundial apontou aproximadamente 300 mil casos novos e 145 mil óbitos, no ano de 2012, por câncer de boca e lábio [1]. CCEB é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo devido a sua alta mortalidade e frequente mutilação [2]. Atualmente, a taxa de sobrevivência em 1 (um) ano é de aproximadamente 81% e, em 5 (cinco) anos, é em torno de 50% [3]. Sendo que, este percentual decai bastante em pacientes com metástase [4].

HIF é um complexo protéico heterodimérico composto pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  não é constitutiva e é sensível ao oxigênio, já a subunidade  $\beta$ , também chamada de ARNT (arylhidrocarbon-receptor translocador nuclease), é expressa constitutivamente na célula [5]. Devido à alta morbidade do CCEB, pesquisadores têm buscado novos fármacos antineoplásicos, que possuam uma maior eficiência em induzir à morte células tumorais, e com poucos ou insignificantes efeitos adversos, neste estudo utilizou-se a Metformina (MET). A MET pertence ao grupo farmacológico das biguanidas, denominado sensibilizadores de insulina, ou seja, não estimulam a liberação de insulina pelo pâncreas, agindo em tecidos periféricos melhorando a resistência insulínica é considerada um agente antihiperlipidêmico e não hipoglicêmico, mesmo quando utilizado em altas doses [6].

Estudos recentes têm demonstrado uma importante associação entre o uso da MET e a prevenção contra diversos tipos de cânceres, cujo mecanismo molecular ainda não está totalmente elucidado [7] Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do ácido gálico na expressão da HIF-1  $\alpha$  em células de carcinoma epidermóide de boca tratadas com ácido gálico sob condições de normóxia e hipóxia.

### **Material e métodos**

#### *A. Cultura de células*

Foram utilizadas células imortalizadas de carcinoma epidermóide de língua (SCC-9), como controle utilizou-se queratinócitos imortalizados (Hacat) cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM F12/DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### *B. Tratamento com Metformina*

As células foram tratadas com 20  $\mu\text{M}/\text{mL}$  de Metformina (Sigma ®) e 50mM cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>). Os grupos foram divididos em: Grupo Controle, células sem tratamento; Grupo Tratado com MET, células tratadas com 20  $\mu\text{M}/\text{mL}$  de AG; Grupo Tratado com CoCl<sub>2</sub>, células tratadas com 50mM CoCl<sub>2</sub> e por último o Grupo associação, as células tratadas com ambos 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MET e 50mM CoCl<sub>2</sub>.

#### *C. Extração de RNA e conversão para cDNA*

A extração de RNA das células foi realizada com o reagente TRIZOL (Invitrogen), segundo instruções do fabricante com algumas modificações. Na etapa inicial, foi adicionado 200 $\mu\text{l}$  de clorofórmio e agitando vigorosamente com as mãos por 15 segundos, seguindo de uma incubação à temperatura ambiente por mais 10 minutos. Centrifugou-se a 10.400 rpm por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubos limpos após centrifugação e acrescentou-se 500 $\mu\text{l}$  de álcool isopropílico, deixando os tubos incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Após os 10 minutos, centrifugou-se a 10400 rpm por 10 minutos, a 4°C, e removido o sobrenadante, deixando apenas o pellet que foi lavado



com 1ml de etanol a 75% . Centrifugou-se esse material a 8600 rpm, por 5 minutos a 4°C. No final do procedimento, o sobrenadante foi descartado e o pellet colocado a uma temperatura ambiente por 10 minutos para secar. O mesmo foi ressuspenso em 20µl de água DEPC (Dietilpirocarbonato), e aquecido a 55°C por 10 minutos. Após a extração verificou-se a integridade do RNA realizando o gel de agarose, as amostras integras foram então convertidas a cDNA.

#### D. *Reação de Transcrição Reversa ( RT )*

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com o Kit SuperScript III First-Strand™ cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando: 2µl de RNA extraído, 2µl do primer reverso, 1µl do dNTP mix (10mM) e 10µl de água DEPC, finalizando um volume de 15µl. Esse mix foi aquecido a 65°C por 5 minutos e colocado no gelo por 1 minuto. Uma mistura contendo 2µl do Buffer (10x), 4µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2µl de ditioneitol DTT (0,1 M), 1µl de RNase out (40U/µl) e 1µl da enzima transcriptase reversa SuperScript III RT (200U/µl) foi preparada e adicionada à primeira mistura contendo o RNA. Os tubos foram incubado a 50°C por 50 minutos e posteriormente a reação foi inativada a 85°C por 5 minutos. Após breve centrifugação, foi adicionado 1µl de RNase H em cada tudo por 20 minutos a 37°C para remoção do RNA molde da molécula cDNA:RNA. O DNA complementar (cDNA) sintetizado foi armazenado a -20°C até o momento de sua utilização.

#### E. *PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)*

A expressão do genes na cultura de células foi avaliada através doPCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Para isso, foi realizado, previamente, a extração do RNA total e sua conversão em DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa. Para as reações de amplificação em tempo real foi utilizado o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), contendo a molécula fluorescente e os demais reagentes necessários à amplificação. Primers específicos do gene de estudo foram baseados em estudos prévios da literatura ou desenhados confecção através do software Primer Express. Foi adotado o método da quantificação relativa para avaliar os níveis de transcrição dos genes estudados. Esse método consiste na comparação dos Cts (Threshold cycle) de cada amostra em relação a um gene endógeno e a uma amostra calibradora, sendo os resultados apresentados em ordem de grandeza.

#### F. *Análise dos dados*

Todos os dados coletados serão digitalizados no programa de estatística SPSS®, versão 18.0, para Windows® e posteriormente submetidos a tratamentos estatísticos específicos.

## Resultados

#### A. *PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)*

Após 24 horas de tratamento as células foram tripsinizadas o RNA foi extraído, verificou-se sua integridade, realizou se a transcrição e avaliou se a expressão das SCC9 e da Hcat. Verificou se que a expressão da HIF-1  $\alpha$  aumentou tanto em condições de hipóxia.

## Discussão

Estes achados corroboram com outros estudos por demonstrarem que na presença de metformina os níveis de HIF1 $\alpha$  estão diminuídos, resultando na inibição de VEGF e redução da angiogênese (8). A redução de HIF1 $\alpha$  regula negativamente o efeito Warburg observado em células neoplásicas, o que contribui para o efeito antineoplásico da metformina (9).

## Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Ainda há um número limitado de estudos que avaliam a MET no CCECP, sendo necessários estudos posteriores que possam aprofundar os conhecimentos sobre o efeito antitumoral desse composto, principalmente no que diz respeito às vias de sinalização que possam levar à modulação de mediadores inflamatórios.



## Referências

1. Chan GG, Tai BC, Liang S, Lim DT, Soo KC. Squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC)--multi-modality treatment and impact on survival. *Asian journal of surgery / Asian Surgical Association*. 2002 Jan;25(1):35-40.
2. Firman R, Heiselman D, Lloyd T, Mardesich P. Pneumoscrotum. *Annals of emergency medicine*. 1993 Aug;22(8):1353-6.
3. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current opinion in oncology*. 2009 May;21(3):194-200.
4. Jeremic B, Milicic B. Pretreatment prognostic factors influencing distant metastasis-free survival in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiation therapy with or without concurrent chemotherapy. *American journal of clinical oncology*. 2009 Oct;32(5):483-7.
5. Kwak JM, Min BW, Lee JH, Choi JS, Lee SI, Park SS, et al. The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 2007 Nov;50(11):1873-80.
6. Radziuk J, Bailey CJ, Wiernsperger NF, Yudkin JS. Metformin and its liver targets in the treatment of type 2 diabetes. *Current drug targets Immune, endocrine and metabolic disorders*. 2003 Jun;3(2):151-69. PubMed PMID: 12769787
7. Duncan BB, Schmidt MI. Metformin, cancer, alphabet soup, and the role of epidemiology in etiologic research. *Diabetes care*. 2009 Sep;32(9):1748-50. PubMed PMID: 19717820. Pubmed Central PMCID: 2732134.
8. Tadakawa M, Takeda T, Li B, Tsuiji K, Yaegashi N. The anti-diabetic drug metformin inhibits vascular endothelial growth factor expression via the mammalian target of rapamycin complex 1/hypoxia-inducible factor-1alpha signaling pathway in ELT-3 cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;399:1-8
9. Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature reviews Endocrinology*. 2014;10:143-56

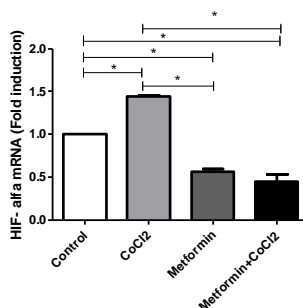


Figura 1. Expressão da HIF-1  $\alpha$  na SCC9 nos diferentes grupos, Grupo Controle; Grupo Tratado com CoCl<sub>2</sub>, Grupo tratado com MET e Grupo tratado com MET e CoCl<sub>2</sub>