



AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NA EXPRESSÃO DE CASPASE-3 EM CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

Karen Fernanda Gomes Oliveira, Lucyana Conceição Farias

Introdução

O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço 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]. O carcinoma epidermóide de boca (CEB) é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo devido a sua alta mortalidade e frequente mutilação [1]. Atualmente, a taxa de sobrevivência em 1 (um) ano é de aproximadamente 81% e, em 5 (cinco) anos, é em torno de 50% [2]; essa frequência reduz consideravelmente em indivíduos que apresentam metástase [3].

Devido à alta morbidade causada pelo CEB, estudos têm buscado novos fármacos antineoplásicos, que possuam uma maior eficiência em induzir à morte células tumorais e com redução dos efeitos adversos.

Neste estudo utilizou-se o medicamento Metformina (MET) para investigar a sua ação sobre a apoptose no CEB; 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 considerado um agente antihiperlipidêmico e não hipoglicêmico, mesmo quando utilizado em altas doses [4].

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 [5].

Este estudo avaliou o efeito apoptótico da MET em células de carcinoma epidermóide através da expressão da caspase 3. A apoptose ou morte celular programada pode ocorrer através de duas vias principais: via extrínseca e a via [6]. As duas vias levam a ativação das caspases iniciadoras e efetoras, as caspases-3 [7]. As caspases efetoras 3 são responsáveis pela execução dos efeitos apoptóticos [8].

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 CO₂.

B. Tratamento com Metformina

As células foram tratadas com 20 µM/mL de Metformina (Sigma®) e 50mM cloreto de cobalto (CoCl₂). Os grupos foram divididos em: Grupo Controle, células sem tratamento; Grupo Tratado com MET, células tratadas com 20 µM/mL de AG; Grupo Tratado com CoCl₂, células tratadas com 50mM CoCl₂ e por último o Grupo associação, as células tratadas com ambos 20 µg/mL MET e 50mM CoCl₂.

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 200µl 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 500µl 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 ressuspendido 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 MgCl₂ (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 do PCR 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 Hacat.

Verificou-se que a expressão da caspase-3 aumentou tanto em condições de hipóxia e normóxia.

Discussão

Estes achados confirmam que a metformina pode inibir a proliferação e promover a apoptose por ativação da caspase na linhagem de CEB, como foi demonstrado em estudo *in vitro* em vários tumores sólidos da próstata, pâncreas, colo-retal e cancro da mama [9,10].

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

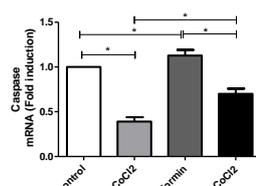
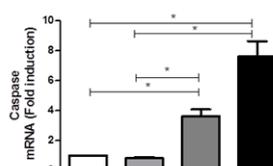
Ainda há um número limitado de estudos que avaliam a MET no CCECP, sendo necessários estudos posteriores que possam aprofundar os conhecimentos sobre o efeito antitumoral desse composto, principalmente no que diz respeito às vias de sinalização que possam levar à modulação de mediadores inflamatórios.

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] Chang MC, Chan CP, Wang WT, Chang BE, Lee JJ, Tseng SK, et al. Toxicity of areca nut ingredients: activation of CHK1/CHK2, induction of cell cycle arrest, and regulation of MMP-9 and TIMPs production in SAS epithelial cells. *Head & neck*. 2013 Sep;35(9):1295-302. PubMed PMID: 22907745.
- [7] Fan CC, Wang TY, Cheng YA, Jiang SS, Cheng CW, Lee AY, et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2013 Oct;139(10):1735-44. PubMed PMID: 23990016.
- [8] Alfarsi MA, Hamlet SM, Ivanovski S. Titanium surface hydrophilicity modulates the human macrophage inflammatory cytokine response. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2014 Jan;102(1):60-7. PubMed PMID: 235959537.
- [9] Janjetovic K, Harhaji-Trajkovic L, Misirkic-Marjanovic M, Vucicevic L, Stevanovic D, Zogovic N, et al. In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. *European Journal of Pharmacology*. 2011 10/15;668(3):373-82.
- [10] Wurth R, Barbieri F, Florio T. New molecules and old drugs as emerging approaches to selectively target human glioblastoma cancer stem cells. *BioMed research international*. 2014;2014:126586. PubMed PMID: 24527434. Pubmed Central PMCID: 3909978.





o FEPEG FÓRUM DE ENSINO,
PESQUISA, EXTENSÃO
E GESTÃO

TRABALHOS CIENTÍFICOS APRESENTAÇÕES ARTÍSTICAS E CULTURAIS DEBATES MINICURSOS E PALESTRAS

23 A 26 SETEMBRO DE 2015
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

ISSN 1806-549X

A HUMANIZAÇÃO NA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

REALIZAÇÃO



APOIO



Figura 1. Expressão da caspase-3 na SCC9 e HacaT nos diferentes grupos, Grupo Controle; Grupo Tratado com CoCl_2 , Grupo tratado com MET e Grupo tratado com MET e CoCl_2