



## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NA EXPRESSÃO DE LACTATO DESIDROGENASE E PIRUVATO DESIDROGENASE EM CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

*Emille Cavalcante de Oliveira, Lucyana Conceição Farias*

### **Introdução**

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]. Dessa forma, constitui-se da neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço, representando cerca de 90% dos cânceres de boca. Coerente a isso, no ano de 2012, a estimativa mundial apontou milhares de casos novos e casos de óbitos por câncer de lábio e boca, aproximadamente 300 mil e 145 mil casos foram constatados, respectivamente [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]; observa-se, porém, que em indivíduos que apresentam metástase essa frequência reduz consideravelmente [3].

A busca por novos fármacos antineoplásicos com maior eficiência em induzir a morte de células tumorais e com efeitos adversos reduzidos é constante. 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 da MET em células de carcinoma epidermóide de boca sob metabolismo glicolítico através da expressão do lactato desidrogenase (LDHA) e da piruvato desidrogenase (PDHA). A glicólise é um processo anaeróbico que resulta em duas moléculas de piruvato, com produção de duas (2) moléculas de ATP. Sob condições de hipóxia, ausência de oxigênio presente em células tumorais potencialmente invasivas, ocorre uma mudança no mecanismo da respiração celular mitocondrial resultando em uma produção de intensa lactato, este fenômeno chamado de glicólise aeróbica ou efeito de Warburg Garber, onde o piruvato é convertido a lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDHA) [6].

O objetivo desta pesquisa foi avaliar uma possível mudança no mecanismo da respiração celular mitocondrial entre os grupos tratados com metformina na presença ou ausência de 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 µM/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 µM/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 µg/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 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 íntegras 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 incubados 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 dos 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 Haca1.

Verificou-se que a expressão da HIF-1  $\alpha$  aumentou tanto em condições de hipóxia e normóxia.

## Discussão

Estes achados corroboram com outros estudos por demonstrarem que na presença de metformina ocorre uma regulação negativa ao efeito Warburg observado em células neoplásicas, aumento da expressão de PDHA e diminuição da expressão de LDHA o que contribui para o efeito antineoplásico da metformina [7].



## 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. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2009 Apr-May;45(4-5):309-16. PubMed PMID: 18804401.
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-1 $\alpha$  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

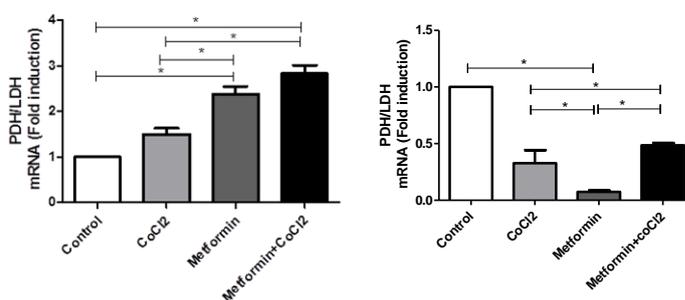


Figura 1. Expressão da PDH/LDH na SCC9 e Hcat nos diferentes grupos, Grupo Controle; Grupo Tratado com CoCl<sub>2</sub>, Grupo tratado com MET e Grupo tratado com MET e CoCl<sub>2</sub>