

2.02.05 - Genética / Genética Humana e Médica

ANÁLISE DA PROTEÍNA ANG-(1-7) E SEU RECEPTOR MAS NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CAVIDADE BUCAL

Ana Kelly da Silva F. Duarte^{1*}, Jéssica A. Gomes², Gabriel C. B. da Silva², Thiago Cavalcanti Leal², Valdemir da Conceição³, Carlos Alberto de Carvalho Fraga⁴

1. Estudante de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Alagoas *campus* de Arapiraca (UFAL)
2. Estudante de Medicina, UFAL
3. Estudante de Enfermagem, UFAL
4. Pesquisador, Prof. Dr. do curso de Medicina UFAL /ORIENTADOR

Resumo

Existem fortes indícios de que a proteína Angiotensina 1-7 (ANG-(1-7)) e seu receptor MAS controlam fatores associados a hipóxia e angiogênese tumoral, tais como o gene HIF-1 α , que pode apresentar um papel fundamental na formação e patogênese do carcinoma de células escamosas de cavidade bucal. Esta pesquisa buscou analisar o efeito da Ang-(1-7) /receptor Mas nesse carcinoma. Para isso, induzimos hipóxia quimicamente, em células HEK293, OSCC-4 e SCC-9, e tratamos com Ang – (1-7) e associados a fim de avaliar a migração, e invasão celular. Ainda, mRNAs foram analisados via real time PCR, e proteínas totais e fosforiladas pela técnica de Western Blot. Ang- (1-7) juntamente com a adição de CoCl₂ reduziram a migração e invasividade de células SCC9, bem como diminuiu a expressão de HIF-1 α e aumentou a expressão de E-caderina, além disso, Ang- (1-7) diminui a fosforilação de AKT e aumentou a transcrição da caspase 3.

Palavras-chave: Hipóxia; Gene HIF-1 α ; Migração celular.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFAL.

Introdução

O CCEB (carcinoma de células escamosas da cavidade bucal) é o sexto carcinoma mais comum do mundo e representa aproximadamente 90% dos tumores malignos da boca. A estimativa de incidência de câncer de boca no Brasil aponta esse tumor como o 5º mais frequente entre os homens (com 9.990 casos estimados) e o 9º entre as mulheres (com 4.180 casos estimados).

O fenômeno da carcinogênese bucal é um processo complexo que ocorre através de múltiplos eventos genéticos e epigenéticos que alteram as funções normais dos genes supressores de tumor e oncogenes. A perda da atividade supressora de tumor leva a um fenótipo celular capaz de aumentar a proliferação celular e a perda da adesão celular, habilitando essas células mutadas a se infiltrarem nos tecidos locais e a se espalharem para sítios distantes. Metástase é a causa de 90% de mortes por câncer e configuram um conjunto diverso de manifestações clínicas. As células do câncer, então, empregam diversas estratégias de auxílio à adaptação e, posteriormente, expansão e progressão em um novo sítio. O fator 1 α indutor de hipóxia (HIF-1 α) é o principal gene envolvido no fenômeno hipóxico, e tem sido associado à metástase em vários tumores sólidos. Espera-se que a inibição da transativação de genes alvo de HIF-1 α tenha um efeito antitumoral. No entanto, os efeitos anticancerígenos diretamente atribuíveis à inibição da transativação do HIF-1 ainda não foram relatados.

Angiotensina-(1-7), é considerada um membro biologicamente ativo do Sistema Renina Angiotensina, este hormônio é um heptapéptido endógeno que inibe a proliferação de células endoteliais, reduz a proliferação de células tumorais, a densidade microvascular, e ainda associa-se, com a redução de fatores de crescimento, tais como VEGF e PlGF, tendo em vista esses dados, os estudos do efeito da proteína Ang-(1-7)/ receptor Mas na hipóxia e angiogênese tumoral podem revelar achados importantes para o comportamento clínico e biológico do CCEB, desse modo, pretende-se com este estudo analisar o o efeito da proteína Ang-(1-7)/ receptor Mas no processo de hipóxia, e compreender o processo de migração e invasão celular após tratamento com Ang-(1-7). Ainda, a realização deste estudo pode possibilitar a identificação de novos alvos para pesquisa terapêutica.

Metodologia

Inicialmente realizamos a cultura de células HEK293, OSCC-4 e SCC-9 (linhagens de carcinoma de células escamosas de cavidade bucal) que foram mantidas em DMEM ou OptiMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1 mM de glutamina, em seguida a indução de hipóxia que foi induzida quimicamente usando CoCl₂ (150 µM). As células, portanto, foram tratadas com Ang-(1-7) 10⁻⁶ M por 15 minutos.

O Ensaio de migração celular foi realizado após a cultura se tornar confluenta, uma lesão na camada unicelular foi realizado com o auxílio de uma ponteira pressionada contra o assoalho da placa de cultura, formando uma fenda na camada de células. Em seguida, a cultura foi lavada três vezes com tampão PBS para a retirada completa de resíduos celulares da fenda formada. Após a realização da lesão na camada unicelular, as células cresceram em meio acrescido de Ang-(1-7) e CoCl₂. As células tratadas em meio DMEM sem os compostos serviram como controle. A média das distâncias totais das áreas das fendas foram calculadas e atribuídas em valores percentuais em relação ao controle.

Os níveis de transcrição dos genes foram avaliados através do real time PCR. O cDNA foi sintetizado em termociclador durante um período de 60 minutos de incubação a 37°C. A reação foi finalizada pelo aquecimento a 90°C por 5 min. As reações de PCR quantitativo foram feitas utilizando primers específicos para o cDNA dos genes anti-HIF-1α, antireceptor Mas e anti-Ang-(1-7).

Em seguida a técnica de western blot foi utilizada para dosagem das proteínas HIF-1α, receptor Mas e Ang-(1-7). As células foram homogeneizadas em uma solução tampão com a seguinte composição em mM: 50 Tris-HCl, 5 EDTA, 150 NaCl, 0,5 MgCl₂ com inibidores de proteases e centrifugados a 8.000 rpm a 4°C durante 12 minutos. As amostras de proteína foram dosadas pelo método de Bradford. Quarenta microgramas de proteína foram aplicados no gel de eletroforese de poliacrilamida (concentração variável 7-12%). Após a corrida de eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em solução PBS-Tween 20 (0,1%) com leite 5% por 1 hora. Posteriormente, as membranas foram lavadas com solução PBS-T (PBS-Tween 0,1%) e incubadas com anticorpos primários por 24 horas. Após lavagem das membranas de nitrocelulose, estas foram incubadas com o anticorpo secundário ligado a peroxidase. A ligação do anticorpo secundário foi visualizada utilizando o Sistema Odyssey LI-COR Infrared.

Os dados foram apresentados como médias ± DP. A significância estatística foi determinada usando de Student's T test e ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de P foram <0,05.

Resultados e Discussão

A angiogênese, o metabolismo glicolítico, a sobrevivência e invasão celular são regulados pela sinalização do gene HIF-1 α . Durante a tumorigênese inicial, a expressão de HIF1 α é necessária para a indução de angiogênese, embora outros fatores possam facilitar esse processo, em nossa pesquisa foi constatado que a administração de Ang- (1-7) inibiu o gene HIF-1 α , os dados aqui relatados estão de acordo com uma observação recente de Giani et al. (20) mostrando que Ang- (1-7) / Mas diminui os níveis de HIF-1 α .

Além disso, a Ang- (1-7) diminuiu a fosforilação de AKT, segundo os estudos de Yung (2011, p. 2) para ser ativada a via AKT depende da fosforilação de duas proteínas, a Thr308 e Ser473 e a proteína Ang (1-7) seria responsável por induzir a fosforilação de AKT. Em boa concordância com nossos resultados, a administração de Ang- (1-7) estimulou a fosforilação rápida de AKT através de um mecanismo dependente do receptor Mas / PI3K. No entanto, o efeito de Ang- (1-7) na ativação de AKT ainda não está claro. A via de sinalização AKT / mTOR estimula a expressão de HIF-1 α sob condições normóxicas, em resposta a certos fatores de crescimento, citocinas e moléculas de sinalização. Portanto, hipotetizamos que essa via poderia participar na indução da estabilização do gene HIF-1 α .

Os ensaios de migração celular foram realizados em células de linhagem de câncer bucal humanas (SCC9), tratadas com CoCl₂ ou / e Ang- (1-7), a migração de células SCC9 diminuiu pelo tratamento realizado com Ang (1-7) combinado a CoCl₂. A invasividade é uma característica importante das células do carcinoma escamoso oral e um alvo para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos. Para confirmar esses dados, usamos PCR quantitativo em tempo real para avaliar os níveis de expressão de mRNA de Col1A, caderina-E e HIF-1 α . Nós constatamos que, Ang- (1-7) diminuiu o HIF1- α e aumentou a caderina-E. Além disso, observamos que o tratamento com Ang- (1-7) aumentou a expressão mRNA. Já o ensaio de morte celular revelou que Ang- (1-7) aumentou significativamente o número de células apoptóticas, como foi o caso do gene caspase 3, onde notamos um aumento significativo em sua transcrição após o tratamento com Ang 1-7 quando comparado as células de controle.

Como esse heptapeptídeo medeia os efeitos biológicos pela ativação de um único receptor acoplado à proteína G, a Ang- (1-7) pode servir como um agente quimioterapêutico mais direcionado e eficaz para o cancro da cabeça e pescoço. Devido ao seu impacto sobre a função de um conjunto diverso de proteínas, Ang- (1-7) e do seu receptor MAS estão envolvidos em respostas metabólicas e processos que influenciam muitos aspectos da função humana. Os estudos existentes descrevem o envolvimento dessa proteína em doenças relacionadas à idade, obesidade, funções cardiovasculares, neurológicas e em diversas neoplasias malignas.

Conclusões

A principal causa de mortalidade pelo carcinoma de células escamosas da cavidade bucal não é a carga tumoral primária, mas a disseminação metastática e as complicações subsequentes, apesar dos avanços na cirurgia e na radioterapia, que continuam sendo as opções de tratamento padrão, a taxa de mortalidade permaneceu praticamente inalterada por décadas, com uma taxa de sobrevida de 5 anos.

Cerca de um terço dos pacientes submetidos à terapia convencional desenvolvem metástases, indicando uma clara necessidade de terapêuticas que visem não apenas as células epiteliais tumorais, mas também o microambiente tumoral para reduzir as metástases. Em conclusão, nossos achados atuais sugerem que a Ang- (1-7) atua na inibição do gene HIF-1 α , a partir da diminuição da fosforilação da via AKT, sendo esse gene responsável por eventos como invasão celular e hipóxia, importantes para a evolução tumoral. Além disso, o receptor Ang- (1-7) / Mas inibe a migração de células do câncer oral, tendo em vista esses dados a Angiotensina- (1-7), pode servir como um agente terapêutico mais direcionado aos genes envolvidos diretamente com a angiogênese tumoral.

Referências bibliográficas

1. Bensaad K, Harris AL. Hypoxia and metabolism in cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;772:1-39.
2. Fraga CA, de Oliveira MV, de Oliveira ES, et al. A high HIF-1alpha expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral Oncol*. 2012;48(2):130-5.
3. Huang D, Li C, Zhang H. Hypoxia and cancer cell metabolism. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2014.
4. Krishnan B, Torti FM, Gallagher PE, Tallant EA. 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*. 2013;73(1):6070.
5. Lauzier MC, Michaud MD, Dery MA, Richard DE. [HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences]. *Bulletin du cancer*. 2006;93(4):349-56.
6. Maxwell P, Salnikow K. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer biology & therapy*. 2004;3(1):29-35.
7. Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, Da Silva VH, Hossaka TA, Oshima CT, et al. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer genomics & proteomics*. 2012;9(5):329-35.
8. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, 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*. 2003;100(14):8258-63.
9. Scully C, Porter S. Oral cancer. *West JMed*. 2001;174(5):348-51.
10. Thomas R, Kim MH. A HIF-1alpha-dependent autocrine feedback loop promotes survival of serum-deprived prostate cancer cells. *Prostate*. 2009;69(3):263-75.
11. Van der Groep P, Bouter A, Menko FH, van der Wall E, van Diest PJ. High frequency of HIF-1alpha overexpression in BRCA1 related breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2008;111(3):475-80.
12. Van Zyl A, Bunn BK. Clinical features of oral cancer. *SADJ : journal of the South African Dental Association = tydskrif van die Suid-Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging*. 2012;67(10):566-9.
13. Van Zyl AW, Marnewick JC. Aetiology of oral cancer. *SADJ : journal of the South African Dental Association = tydskrif van die Suid-Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging*. 2012;67(10):554-6.
14. Wolff KD, Follmann M, Nast A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Deutsches Arzteblatt international*. 2012;109(48):829-35.
15. Yung HW, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Regulation of AKT Phosphorylation at Ser473 and Thr308 by Endoplasmic Reticulum Stress Modulates Substrate Specificity in a Severity Dependent Manner. *PLoS ONE* 6(3): e17894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017894>.
16. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Sun Y. Angiotensin 1-7 Promotes Cardiac Angiogenesis Following Infarction. *Current vascular pharmacology*. 2013.
17. Zimmerman D, Burns KD. Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clinical science*. 2012;123(6):333-46.