

INFLUÊNCIA DA MnSOD NA CARCINOGENESE CERVICAL INDUZIDA POR *Papillomavirus* HUMANO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM ARTEPILLIN C

André Luiz Gargioni de Andrade (PIBIC/CAPES/UEM), Analine Rosa Barquez de Assis Carvalho, Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke, Raquel Pantarotto Souza Padovan, Bianca Alirão Ratti, Márcia Edilaine Lopes Consolaro, Vânia Ramos Sela da Silva (Orientador), e-mail: vanciasela@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

Ciências da Saúde- Farmácia

Palavras-chave: câncer cervical, Artepillin C, HPV.

Resumo:

O câncer cervical (CC) é a terceira neoplasia mais comum entre as mulheres no Brasil, e as opções de tratamento com efeitos citotóxicos para evitar o seu avanço são limitadas. Artepillin C, composto polifenólico derivado da própolis brasileira, tem sido alvo de muitos estudos, e tem mostrado atividade indutora de apoptose, antitumoral, entre outras. Pesquisas recentes indicam que a superexpressão da enzima superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) é uma característica de diversos tipos de cânceres. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da MnSOD na carcinogênese cervical induzida por HPV e o tratamento das células com Artepillin C. Foram usadas as linhagens de células HeLa, SiHa, CaSki, C33A e HaCaT. As células foram expostas ao Artepillin C diluído em DMEM (0,75-100 μ M) durante 24, 48 e 72 h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). A expressão de MnSOD foi avaliada através do Western blot. Artepillin C exerceu efeitos citotóxicos dependentes da concentração em todas as linhagens celulares de CC testadas, e mostrou seletividade de ação para estas, pois não reduziu significativamente a viabilidade de HaCaT, mostrando que pode ser uma promissora alternativa como nova estratégia terapêutica ou adjuvante no tratamento do CC. Ainda, houve superexpressão de MnSOD nas linhagens celulares HeLa e SiHa, sugerindo que esta pode atuar como um regulador crítico do metabolismo das células tumorais e pode vir a ser um biomarcador da progressão do câncer.

Introdução

O câncer cervical (CC) é a terceira neoplasia mais comum entre as mulheres no Brasil, com aproximadamente 18.000 novos casos por ano. A infecção persistente pelo *Papillomavirus* Humano (HPV) de alto risco carcinogênico

(AR) é considerada um fator essencial na sua gênese. As opções de tratamento com efeitos citotóxicos para evitar o avanço do CC são limitadas.

A própolis brasileira recolhida pelas abelhas a partir de uma planta chamada Alecrim-do-campo é rica em um composto polifenólico, o Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico). O Artepillin C tem sido alvo de muitos estudos, e tem mostrado atividade indutora de apoptose, antitumoral, entre outras. Desta forma, vem sendo investigado em uma variedade de linhagens celulares de câncer, e tem apresentado resultados significativos, principalmente por levar estas células ao processo de apoptose.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são importantes reguladores globais de sinalização celular e são produzidos na mitocôndria por processos fortemente modulados pela superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD), enzima responsável pela detoxificação da organela. Porém, MnSOD nem sempre age como um antioxidante mitocondrial, pois na ausência de um mecanismo integrado de remoção de H₂O₂, a superexpressão desta é prejudicial para a integridade mitocondrial. A alta expressão de MnSOD é uma característica dos cânceres, especialmente em estágios avançados. Pesquisas recentes mostram que a super-regulação desta enzima induz a disfunção mitocondrial com grande dano oxidativo basal, e que existe uma super-regulação na saída de H₂O₂ da mitocôndria quando a MnSOD é superexpressa.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da MnSOD na carcinogênese cervical induzida por HPV e o tratamento das células com Artepillin C.

Materiais e métodos

Linhagens celulares e condições de cultura.

Foram usadas linhagens celulares humanas derivadas de CC, HeLa (HPV 18), SiHa (HPV 16), CaSki (HPV 16 bem como HPV 18), C33A e a linhagem de queratinócitos humanos imortalizados HaCaT (controle).

Tratamentos

Para o tratamento, Artepillin C foi disperso em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 400 mM e armazenada a -20°C. Após atingir 70% - 80% de confluência, as células foram expostas ao Artepillin C diluído em DMEM (0,75-100 µM) durante 24, 48 e 72 h. As células tratadas apenas com DMEM ou DMSO (0,5% de concentração final) foram utilizadas como controle em todos os ensaios.

Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), baseado na capacidade de células vivas reduzirem MTT em formazan de coloração roxa através da desidrogenase mitocondrial. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células do controle (100% da viabilidade celular), e os dados foram mostrados como valores médios ± desvio padrão (DP) de três experiências independentes em triplicata. Os valores de IC₅₀ foram obtidos por análise de regressão não linear dos dados usando Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

Expressão da MnSOD por Western Blot

Células HaCaT, HeLa e SiHa (2,5 x 10⁵ células / ml) foram plaqueadas, incubadas e depois lisadas para extração de proteínas. Os lisados de proteínas foram transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas durante 60 minutos, lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo primário anti-MnSOD de coelho (Abcam; 1:1000), durante a noite à 4 °C. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (1: 5.000) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens, os sinais de proteína foram analisados pelo sistema Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com GraphPad Prism usando análise de variância unidirecional (ANOVA) com teste Tukey. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. Valores de p < 0,05 foram considerados significativos.

Resultados e Discussão

Artepillin C exerceu efeitos citotóxicos dependentes da concentração em todas as linhagens celulares de CC testadas, e mostrou seletividade de ação para estas, pois não reduziu significativamente a viabilidade de HaCaT nas concentrações testadas. Os valores IC₅₀ são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Efeitos citotóxicos do Artepillin C nas linhagens celulares de câncer cervical (HeLa, SiHa, CaSki e C33A) e em linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT)

	IC ₅₀ (µm)		
	24 h	48 h	72 h
HeLa	31	19	9
SiHa	19	17	5
CaSki	37	20	11
C33A	40	21	11
HaCaT*	-	-	-

Valores aproximados de IC₅₀ determinados de acordo com a viabilidade celular. Cada linha representa a média ± DP de três experiências separadas em triplicata. *Para HaCaT, o valor IC₅₀ foi >100 µM.

A expressão de MnSOD foi avaliada através do Western blot e nossos resultados mostraram que as células HeLa e SiHa expressaram significativamente mais MnSOD em comparação com as células HaCaT, conforme figura 1. Assim, foi observado que as células epiteliais cervicais infectadas pelo HPV superexpressam MnSOD, o que está de acordo com outros estudos que mostram a superexpressão de MnSOD em outros tipos de câncer, concordando com a idéia do MnSOD como um membro-chave da via destrutiva relativos aos estágios avançados de câncer.

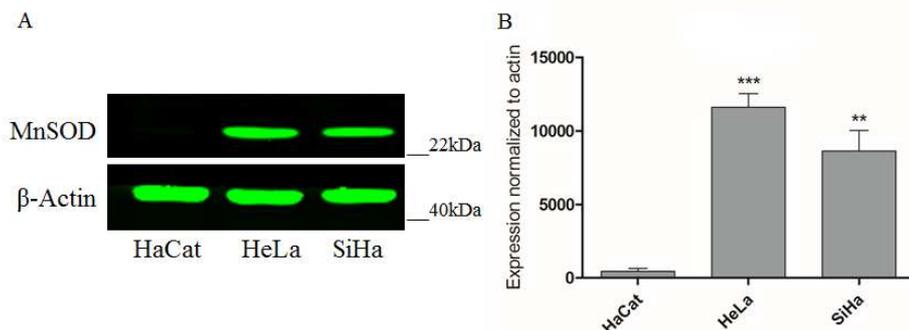


Figura 1: Células epiteliais cervicais infectadas pelo HPV superexpressaram MnSOD.

A: Western blot de células HaCat, HeLa e SiHa com anticorpo anti-MnSOD. B: Imagens representativas usando o software ImageJ. Resultados expressos como média da fluorescência \pm DP de três experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,01$ comparados com as células HaCat.

Conclusões

Artepillin C exerceu efeito citotóxico seletivo dependente da concentração nas linhagens celulares de CC testadas, mostrando que pode ser uma promissora alternativa como nova estratégia terapêutica ou adjuvante no tratamento do CC. Ainda, houve superexpressão de MnSOD nas linhagens celulares HeLa e SiHa, sugerindo que esta pode atuar como um regulador crítico do metabolismo das células tumorais e pode vir a ser um biomarcador da progressão do câncer.

Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), fornecedor da bolsa de Iniciação Científica através do projeto Procad; Dra. Luisa L. Villa (Faculdade de Medicina, USP) e Dr. Silvy S. Maria-Engler (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP).

Referências

1. Ansenberger-Fricano K, Silva Ganini DD, Mao M, Chatterjee S, Dallas S, et al. **The peroxidase activity of mitochondrial superoxide dismutase.** Free Radic Biol Med, 2012 (54):116-24.
2. Hart PC, Mao M, de Abreu AL, Ansenberger-Fricano K, Ekoue DN, Ganini D, Kajdacsy-Balla A, Diamond AM, Minshall RD, Consolaro ME, Santos JH, Bonini MG. **MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer.** Nat Commun. 2015 (6): 6053.
3. Instituto Nacional De Câncer. Estimativa 2016. **Incidência do Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2015.
4. Szliszka E, Zydowicz G, Mizgala E, Krol W. **Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis.** Int J Oncol, 2012 (41): 818-828.