

INFLUÊNCIA DO OCTÂMERO QUATRO (OCT4) NA CARCINOGENESE CERVICAL INDUZIDA POR HPV EM LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA CERVICAL HUMANO TRATADAS E NÃO TRATADAS COM ARTEPILLIN C

Ana Paula Trevisan (PIBIC/CAPES/Uem), Analine Rosa Barquez de Assis Carvalho, Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke, Raquel Pantarotto Souza Padovan, Bianca Altrão Ratti, Vânia Ramos Sela da Silva, Márcia Edilaine Lopes Consolaro (Orientador), e-mail: melconsolaro@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde/Farmácia

Palavras-chave: carcinogênese cervical, HPV, artepillin C

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 octâmero quatro (OCT4) é uma característica de diversos tipos de cânceres. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da OCT4 na carcinogênese cervical induzida por HPV em linhagens de células de carcinoma cervical humano tratadas e não tratadas com Artepillin C. Foram usadas 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 exclusão pelo corante azul de tripan. A expressão da OCT4 foi avaliada através do Western blot. Artepillin C exerceu efeitos citotóxicos dependentes da concentração em HeLa, SiHa, CaSki e C33A e mostrou seletividade de ação para células de CC, pois não reduziu a viabilidade de HaCaT. A morte celular induzida pelo composto foi do tipo apoptose. Ainda, nossos resultados também mostraram que as células HeLa e SiHa superexpressam OCT4. Nossa hipótese é que a superexpressão de OCT4 pode atuar como um regulador crítico do metabolismo das células tumorais e um biomarcador da progressão do câncer.

Introdução

O câncer cervical (CC) é a terceira neoplasia mais comum entre as mulheres no Brasil, com uma estimativa de 16.370 novos casos por ano (INCA, 2018). A infecção persistente pelo *Papillomavirus* Humano (HPV) de alto risco carcinogênico é o fator essencial na sua gênese (CONSOLARO e MARIA-

ENGLER, 2012). 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 (SZLISZKA et al., 2012).

A recente demonstração de que células diferenciadas somáticas podem ser reprogramadas pela expressão de um número limitado de fatores de transcrição específicos, em conjunto denominados OSK redefiniu a compreensão da biologia celular de vários cânceres. Notavelmente, estes estudos indicaram que estes fatores intrínsecos, quando ativados, podem reprogramar células somáticas diferenciadas para que as mesmas adquiram características hiperproliferativas, invasoras e desdiferenciadas, permitindo-lhes proliferar indefinidamente e invadir tecidos. Dentre os OSK, a OCT4 desempenha papel crítico na manutenção da pluripotência das células-tronco embrionárias. Estudos recentes têm relacionado OCT4 com diferentes linhagens de células tumorais humanas, mas pouco foi ainda elucidado sobre seu envolvimento na carcinogênese cervical (WANG et al., 2013). O objetivo desse projeto foi avaliar a influência do OCT4 na carcinogênese cervical induzida por HPV em linhagens de células de carcinoma cervical humano tratadas e não tratadas com Artepillin C.

Materiais e métodos

Linhagens celulares, condições de cultura e tratamentos.

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). Artepillin C foi disperso em dimetilsulfóxido (DMSO) a concentração de 400 mM, 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 72h. Células tratadas apenas com DMEM ou DMSO (0,5% de concentração final) foram utilizadas como controle em todos os ensaios.

Ensaio de viabilidade celular

Foi determinada pelo ensaio de exclusão pelo corante azul de tripan. 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 experimentos independentes em triplicata. Os valores de IC₅₀ foram obtidos por análise de regressão não linear dos dados usando Graph Pad Prism (San Diego, EUA).

Análise da morte celular por apoptose

Foi determinado por Anexina V-FITC/iodeto de propídio (PI) onde 1,0x 10⁴ células/mL foram plaqueadas e tratadas com artepillin C (IC₅₀ para cada linhagem celular) durante 48 h. Após, as células foram lavadas com PBS e tampão de ligação (HEPES 10 mM, pH 7,5, contendo NaCl 140 mM e CaCl₂

2,5 mM) e coradas com 1 ug de Anexina V conjugada com FITC durante 15 min e 40 µg/ mL de PI durante 5 min. Camptotecina 20 µM/digitonina 80 µM foram utilizados como controles positivos para apoptose e necrose, respectivamente. Células não tratadas com artepillin C foram utilizadas como controles negativos. Cada amostra foi analisada utilizando um microscópio fluorescente de invertido (EVOS, EUA) para distinguir as células apoptóticas (verde) e necróticas (vermelha).

Expressão da OCT4 por Western Blot

Células HaCaT, HeLa e SiHa ($2,5 \times 10^5$ 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 min, lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo primário anti-OCT4 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 hs/temperatura ambiente. Após lavagens, os sinais de proteína foram analisados pelo sistema Odyssey CLX Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, NE).

Análise estatística

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 IC_{50} são mostrados na Figura 1.

Tabela 1 - Efeitos citotóxicos do Artepillin C nas linhagens celulares de HeLa, SiHa, CaSki, C33A e 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 IC_{50} determinados de acordo com a viabilidade celular. Cada linha representa a média ± DP de três experiências separadas em triplicata. *Para HaCaT, o valor IC_{50} foi >100 µM.

A apoptose celular aumentou consideravelmente nas células de CC tratadas com artepillin C, em comparação com o grupo controle. A Figura 3a mostra que células de CC expressaram níveis de OCT4 significativamente maiores que as HaCat. A expressão de OCT4 foi em torno de 6 vezes maior em células HeLa e SiHa em comparação com células de HaCat (Fig. 3b).

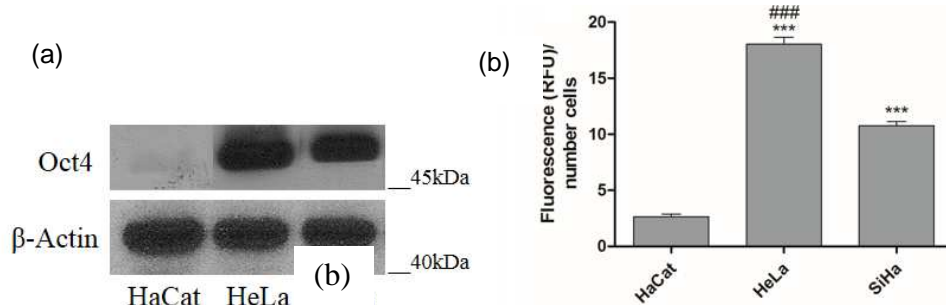


Figura 1: Células epiteliais cervicais infectadas por HPV expressaram OCT4. (a): Western blot de células HaCat (controle negativo), HeLa e SiHa ($2,5 \times 10^5$ cel/ml) with anticorpo anti-OCT4. A expressão de Oct4 foi normalizada com a expressão de β -actina. (b): Imagens representativas da expressão OCT4 que foram analisadas usando o software ImageJ. Os resultados são expressos como a fluorescência média \pm DP de três experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ comparando células epiteliais cervicais com células de HaCat. ### $p \leq 0,001$ comparando células HeLa com SiHa.

Conclusões

Artepillin C exerceu efeito citotóxico seletivo dependente da concentração nas linhagens celulares de CC testadas, podendo ser uma promissora alternativa terapêutica/ adjuvante no tratamento do CC. Ainda, os presentes resultados mostraram que a superexpressão de OCT4 pode atuar como um regulador crítico do metabolismo das células tumorais e um biomarcador da progressão do câncer. Por fim, experimentos futuros deverão ser realizados, a fim de avaliar se o tratamento *in vivo* com Artepillin C altera a expressão da OCT4 em animais com câncer.

Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

CONSOLARO, M. E. L., MARIA-ENGLER S. S. **Citologia Clínica Cérvico - Vaginal: Texto e Atlas**. São Paulo, Brasil, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. INCA. Brasil. [homepage da internet]. [Acesso em: 12/07/2018]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp?ID=5>

SZLISZKA, E. et al. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 41, p. 818-828, 2012.

WANG, Y.D. et al. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 8, p. e760, 2013.