



Autor(es): JOÃO VITOR DA SILVA RODRIGUES, ALFREDO MAURICIO BATISTA DE PAULA, ANA PAULA FONSECA OLIVEIRA, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, AMANDA SOUTO MACHADO, CARLOS ALBERTO DE CARVALHO FRAGA

## Angiotensina 1-7 diminui a expressão de HIF-1 $\alpha$ em células do Carcinoma de Células Escamosas de Boca submetidos à hipóxia

### Introdução

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) é responsável por 16% a 40% de todas as neoplasias malignas humanas (BAVLE *et al.*, 2016). A hipóxia é uma das condições do microambiente de tumores sólidos que podem contribuir para a progressão do tumor, nesse caso através da regulação do fator induzível pela hipóxia 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ), um fator de transcrição sensível ao oxigênio (HAN *et al.*, 2016). Mecanismos patológicos de hipóxia induzidos pela expressão de HIF-1 $\alpha$  promovem aumento das taxas de mutação, expressão de genes associados com a angiogênese tumoral e ativação de mecanismos de invasão tecidual por células metastáticas. Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um hormônio composto de sete peptídeos que faz parte do sistema renina-angiotensina (ZHAO *et al.*, 2013). Estudos apontaram que Ang-(1-7) reduz o crescimento de células cancerosas de pulmão e próstata, com concomitante decréscimo no fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (KRISHNAN *et al.*, 2013). A diminuição do crescimento do tumor por Ang-(1-7) está associada com a proliferação celular e o comportamento metastático. Além disso, a Ang-(1-7) é um ligante endógeno para o receptor Mas, um receptor acoplado à proteína G, a qual é mediadora da transmissão de diversos tipos de sinais. As identificações do receptor Mas tem fornecido valiosas informações bioquímicas e moleculares acerca da significância biológica de Ang-(1-7) (SANTOS *et al.*, 2003). Nesse estudo, objetivou-se investigar os efeitos da administração de Ang-(1-7)-Mas sobre a expressão de HIF-1 $\alpha$  em uma linhagem celular de CCEB submetidas a condições de hipóxia.

### Material e métodos

#### A. Reagentes

Os anticorpos foram adquiridos da Cell Signaling (Beverly, MA, USA): anticorpos policlonais de coelho anti-HIF-1 $\alpha$  e anti- $\beta$ -actina (4967). Os anticorpos policlonais IgG anti-mouse e IgG anti-rabbit conjugados com peroxidase (HRP) foram comprados da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Angiotensina-(1-7) foi comprada da Bachem Americas, Inc. (Torrance, CA). HPBCD foi adquirido da CERESTAR<sup>®</sup> e o HPBCD-Ang-(1-7) foi preparado no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (Brasil). Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

#### B. Cultura de células e tratamentos

Fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) foram semeados em placas de cultura de 150 mL e mantidas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. Células MEF provenientes de animais tipo selvagem (WT), MASKO (animais *knockout* para o receptor Mas) e ACE2KO (animais *knockout* para a enzima ACE2) foram utilizados. Células OSCC-9 foram provenientes de biópsia de língua humana, cultivadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> em meio de cultivo F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 400 ng/mL de hidrocortisona (Sigma, St. Louis, MO) e 10% de soro fetal bovino. O cultivo de células em condições de normóxia foi realizado em incubadora úmida com 5% CO<sub>2</sub>, 95% umidade e temperatura de 37°C. Para cultura em hipóxia, as células foram incubadas com 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> por 24 horas e mantidas em 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Os tratamentos foram realizados com as células incubadas com 1) solução tampão PBS, 2) CoCl<sub>2</sub>, 3) Ang-(1-7) e 4) CoCl<sub>2</sub> + Ang-(1-7).

#### C. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi utilizado para definir as concentrações de CoCl<sub>2</sub> adequadas para as análises das expressão proteica por western blot. Células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1  $\times$  10<sup>4</sup> células/poço, cultivadas por 12 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, e tratadas com diferentes concentrações de CoCl<sub>2</sub> (50, 100, 150, 200  $\mu$ mol/L) por 24 h. Posteriormente, solução de MTT (50  $\mu$ g/10 $\mu$ L) foi adicionada às células e incubada por 4 horas. Em seguida, 200  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço após a remoção da solução de MTT. A viabilidade celular foi avaliada após medida da absorbância a 490 nm em equipamento Enzyme-labeling (EX-800 type). Todos os procedimentos foram realizados em triplicatas. A curva de crescimento das células foi realizada usando a variável tempo como abscissa e absorbância (média  $\pm$  desvio padrão) como ordenada.

#### D. Reações de western blot para análise da expressão proteica de HIF-1- $\alpha$

Proteínas foram extraídas das células, posteriormente separadas usando géis SDS-PAGE (10%), e então transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com tampão de bloqueio Odyssey 1  $\times$  (LICOR Biosciences, Lincoln,

# 10<sup>o</sup>

# FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA  
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE  
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Nebraska, USA). Os anticorpos primários utilizados foram HIF-1 $\alpha$  115 kDa (1 : 1000),  $\beta$ -actin 45 kDa (1 : 1000). O anticorpo secundário foi diluído de 1:15000. Os blots foram visualizados e analisados usando o sistema de imagem Odyssey Infrared Imaging System (LICOR Biosciences).

### E. Análise estatística

Todos os procedimentos estatísticos foram feitos no programa Statistical Package for the Social Science SPS 20.0 para Windows. Inicialmente os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão (DP). Comparações foram testadas utilizando-se o teste ANOVA. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## Resultados e discussão

A expressão de HIF-1 $\alpha$  foi aumentada em todos os tipos celulares e tempos de tratamento investigados após a indução da condição de hipóxia com CoCl<sub>2</sub>. Foi identificada uma diminuição da expressão proteica de HIF-1 $\alpha$  após incubação com Ang-(1-7) em todos os tipos celulares e períodos de tratamento. Os níveis da proteína HIF-1 $\alpha$  foram significativamente inferiores em MEF tratado com CoCl<sub>2</sub> + Ang-(1-7) quando comparadas com o tratamento CoCl<sub>2</sub> isolado ( $p < 0,05$ ). Nas células MASKO (células sem o receptor Mas), nenhuma diferença foi observada na expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  independente da ocorrência de hipóxia isolada ou em associação com Ang-(1-7) (Figura 1). Na linhagem OSCC-9, a expressão de HIF-1 $\alpha$  foi significativamente menor na condição de hipóxia incubada com Ang-(1-7) quando comparada à hipóxia isolada nos períodos de 24h e 48h. Em células OSCC-9, assim como em fibroblastos normais, a Ang-(1-7) reduziu os níveis da proteína HIF-1 $\alpha$ . Em concordância com resultados de outros estudos, a administração de Ang-(1-7) inibiu o principal gene envolvido no fenômeno de hipóxia, o HIF-1 $\alpha$ . Como o HIF-1 $\alpha$  medeia os efeitos biológicos da angiogênese tumoral por ativação do receptor acoplado à proteína G, o receptor Mas (SANTOS *et al.*, 2003), a administração de Ang-(1-7) pode atuar como uma molécula terapêutica para o CCEB.

## Conclusões

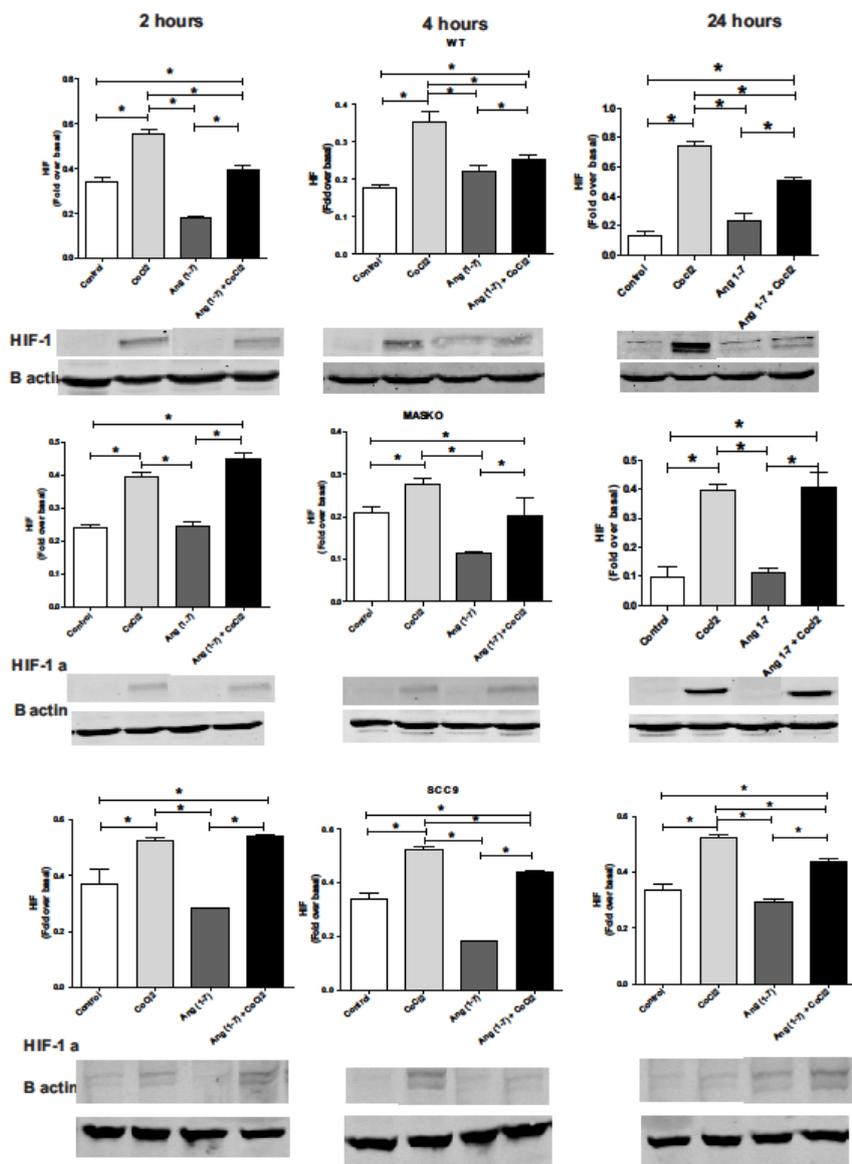
Os resultados do presente estudo sugerem que a administração de Ang-(1-7) em células do CCEB determina uma menor expressão proteica de HIF-1 $\alpha$  especialmente na condição de hipóxia, num mecanismo dependente do receptor Mas.

## Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais (Fapemig) e a coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio. Agradecemos também a Diretoria Acadêmica do Hospital Universitário Clemente de Faria (HUCF/Unimontes) pelo suporte dado a esse projeto de pesquisa.

## Referências bibliográficas

- BAVLE, R. M. *et al.* Molecular Classification of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 9, 2016.
- KRISHNAN, B. *et al.* 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**, v. 73, n.1, p. 60-70, jan. 2013.
- SANTOS, R. A. *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**, v. 100, n. 14, p. 8258-63, jul. 2003.
- ZHAO, W. *et al.* Angiotensin 1-7 Promotes Cardiac Angiogenesis Following Infarction. **Current vascular pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 37-42, 2015.



**Figura 1.** Expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  em células MEF tipo selvagem (WT), MASKO e de Carcinoma de células escamosas bucal (OSCC-9) em condições de normóxia (controle), de hipóxia induzida com CoCl<sub>2</sub>, tratamento com Ang-(1-7) e a combinação de Ang-(1-7) e CoCl<sub>2</sub>. \* representam p<0,05.