



Autor(es): AMANDA DIAS SILVA ANDRADE, LORENA BARBOSA COSTA, SABRINA FERREIRA DE JESUS, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, PABLO VINICYUS FERREIRA CHAGAS, CARLOS ICARO DE JESUS SILVA

## Efeito da Hipóxia na Metilação e Expressão de E-caderina

### Introdução

O câncer oral é um importante problema de saúde pública. Ele traz muitas consequências, porque o seu tratamento produz mutilação, além do fato de que ele pode levar a morte (ALMEIDA, 2016). Carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é a neoplasia maligna mais comum que ocorre na boca. No entanto, a sobrevivência dos pacientes com CCEO não melhorou significativamente (FRAGA, 2012). O ambiente hipóxico promove o desenvolvimento CCEO. Além disso, um ambiente hipóxico pode aumentar a invasão de células CCEO, levando a um pior diagnóstico. Curiosamente, as mudanças na célula-matriz extracelular (ECM) composição também induzir invasividade tumoral (GUIMARÃES, 2016). O complexo juncional é um sistema de proteínas de membrana que controla a adesão celular. Entre as moléculas envolvidas na adesão celular estão as caderinas. Estudos recentes sugerem que a diminuição da expressão de E-caderina poderia ser usada para identificar lesões com risco potencial de malignização (ALVES, 2012). As mudanças epigenéticas constituem um importante mecanismo que controla a expressão de E-caderina, especificamente, a hipermetilação da região promotora. Considerando que a hipóxia é um fator importante associada a uma redução da expressão de E-caderina e a invasão de células, o objetivo deste estudo foi investigar a associação entre o estado de metilação E-caderina, hipóxia e CCEO (OZAWA, 2014).

### Material e métodos

#### A. Cultura de Células

Foi utilizada uma linhagem de células imortalizadas de carcinoma de células escamosas de língua (SCC9). Essas células foram cultivadas em meio de cultura modificado por Dulbecco (DMEM), com 10% de soro fetal de bovino (FBS), 400 ng/mL hidrocortisona, e uma solução de antibiótico / antimicótico a 37 ° C numa atmosfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Células HaCaT foram cultivadas em DMEM, suplementado com 10% de FBS a 37 ° C com 5% de CO<sub>2</sub> numa atmosfera humidificada. Células SCC9 e HaCat (1x10<sup>5</sup>) foram sincronizadas com 24 h privação de soro para se obter sincronização das culturas. Todos os tratamentos foram realizados na ausência de FBS.

#### B. Tratamento Hipóxico

Depois das células terem sido cultivadas num meio isento de soro, as linhas celulares SCC9 e HaCat foram divididos em dois grupos: controle e submetidos a tratamento de hipóxia. 100 μM de CoCl<sub>2</sub>, um indutor químico de hipóxia, foi adicionada no meio isento de soro no grupo de tratamento por um período de 24 horas.

#### C. Ensaio de zero ferida

A migração celular foi monitorizada num ensaio zero ferida. Resumidamente, um arranhão foi feito com uma ponta de pipeta estéril numa camada de células, lavou-se duas vezes em PBS, e, em seguida, 100 μM de CoCl<sub>2</sub> foi adicionado a uma meio isento de soro. Os poços foram fotografados no início do experimento e após 24 h.

#### D. PCR-RTq

A expressão do gene da E-caderina em linhas celulares em estudo foi avaliada por quantitativo real-tempo-PCR (qRT-PCR), após a realização da extração de RNA usando Trizol. Depois por meio de uma de uma enzima o RNA foi convertido em DNA. Para as reações de amplificação, 2 μl de DNAc foram adicionados à SYBR® Green PCR Master Mix, um reagente que contém uma molécula fluorescente, juntamente com os outros reagentes necessários requeridos para a amplificação.

#### E. A análise da E-caderina de metilação da região promotora

A extração de ADN foi realizada a partir de amostras criopreservadas (-80 ° C), usando o kit Dneasy Tissue Kit QIAGEN® de acordo com o protocolo do fabricante e após amplificados por PCR. Os produtos de PCR eram analisados por electroforese em gel de acrilamida a 10% corado com prata, e o perfil de metilação de cada amostra foi observado (Figura Suplementar S1).



#### F. Pacientes

Este estudo envolveu a análise dos dados clínicos e de material biológico a partir de 68 indivíduos distribuídos nas seguintes categorias: Oral Mucosa (OM, n = 15), Lesão potencial maligno oral (pmol, n = 18) e CEB (n = 36). A aprovação ética para este estudo foi obtida a partir do Institutional Review Board (CAAE number: 35499414.0.0000.5146). Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado.

#### G. Análise Estatística

Todos os dados foram transferidos para o programa SPSS®, versão 18.0 (Windows®) e o software GraphPad Prism (versão 5.0, Software GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram submetidos às seguintes tratamentos estatísticos: qui-quadrado e de Fisher testes estatísticos exactos. Além disso, os dados foram avaliados usando o teste post Tukey. A significância estatística aceita foi  $p < 0,05$ .

### Resultados e discussão

Em hipóxia há menor expressão de RNAm da E-caderina comparado ao grupo de controle para as linhas de células HaCat e SCC9 (Figura 1A e B, respectivamente). Por outro lado, não foram observadas diferenças em E-caderina entre HaCat e células SCC9 (Figura 1C). O perfil de metilação de células HaCat e linhas SCC9 foi avaliada por metilação Específico-PCR (PCR-MS). O gene da E-caderina foi apresentado como metilado em células SCC9 e como não metilado em HaCat células (Figura 1D). Como mostrado na Figura 2, hipóxia aumentou a migração de células SCC9 e HaCat. OS perfis de metilação da E-caderina de OM, pmol e CCEO foram comparados (Tabela 1). De acordo com nossas descobertas, a maioria das amostras apresentaram genes da E-caderina não metilados. Além disso, a comparação entre OM, pmol e CCEO mostrou que não houve diferença significativa no estado de metilação da E-caderina ( $p > 0,05$ , Tabela 1). Além disso, os nossos resultados não mostraram uma associação significativa entre os estados de metilação da E-caderina e variáveis clínico-patológicas, tais como tamanho tumor, metástase loco-regional, grau de morfologia, grau morfológica na frente invasiva, relacionada com pmol e CCEO.

Redução da expressão de E-caderina é considerado o evento central no processo metastático uma vez que existe uma redução da aderência celular, o que permite a invasão de células tumorais. A manutenção da adesão celular pode impedir a migração e a invasão de células tumorais. No estudo atual, o ambiente hipóxico interferiu nos níveis do RNAm de E-caderina em células SCC9 e HaCat. O presente estudo demonstra que os ambientes hipóxicos não alterou o perfil de metilação de E-caderina em culturas de células. Nosso estudo indicou que a hipóxia aumentou a migração celular.

### Conclusão

Em conclusão, o presente estudo demonstra que a hipóxia reduz a expressão de E-caderina e migração aumento de células, independentemente do perfil de metilação. Além disso, há diferenças nos padrões de metilação E-caderina foram observadas entre OM, pmol e CCEO.

### Agradecimentos

Este estudo foi apoiado por bolsas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr. Guimarães, Dr. Colleta, Dr. Santos e Dr. de Paula são bolsistas do CNPq de pesquisa.

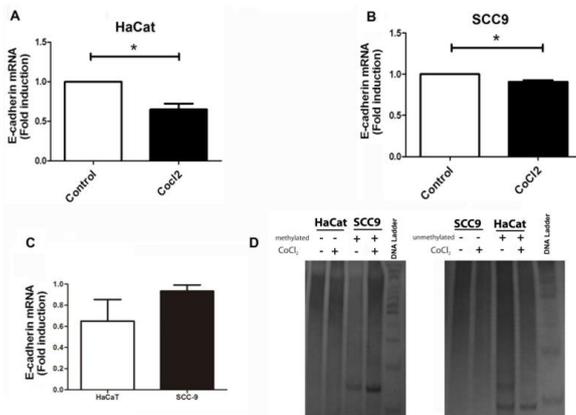
### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C.M. *et al.* Increasing demonstration of angiogenic markers in skin neoplastic lesions. *Pathol Res Pract* 212 (2016) 101-105.
- ALVES, L.R. *et al.* High HIF-1alpha expression genotypes increase odds ratio of oral cancer. *Head & neck oncology* 4 (2012) 87.
- FRAGA, C.A. *et al.* A high HIF-1alpha expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral Oncol* 48 (2012) 130-135.
- GUIMARÃES, T.A. *et al.* Evaluation of the antineoplastic activity of gallic acid in oral squamous cell carcinoma under hypoxic conditions. *Anticancer Drugs* 27 (2016) 407-416.
- OZAWA, M.; KOBAYASHI, W. Cadherin cytoplasmic domains inhibit the cell surface localization of endogenous E-cadherin, blocking desmosome and tight junction formation and inducing cell dissociation. *PLoS One* 9 (2014) e105313

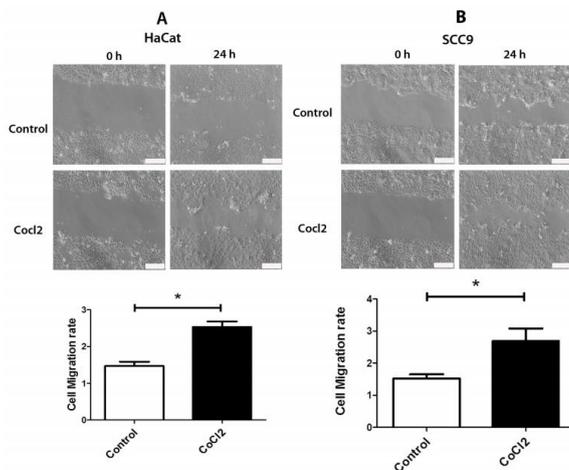


**Tabela 1.** Distribuição dos grupos de acordo com o perfil de metilação do gene E-caderina na região promotora.

Variáveis	Status e Metilação da E-Caderina		p
	Metilado	Não Metilado	
<b>Grupos</b>			
Mucosa Oral	3 (20.0%)	12 (80.0%)	
Lesões Oraís Potencialmente Malignizáveis	6 (33.3%)	12 (66.7%)	
CCEO	12 (33.3%)	24 (66.7%)	0.611
Células SCC9	100%	0%	
Células SCC9 em hipóxia	100%	0%	NA
Células HaCat	0%	100%	
Células Hacat em hipóxia	0%	100%	NA



**Figura 1.** A expressão de E-caderina de ARNm em linhas de células sob condições de normóxia e hipóxia HaCat (A) e SCC9 (B). Nossos resultados mostraram uma diminuição significativo do ARNm da E-caderina em linhas celulares sob condição hipóxica em comparação com o grupo de controle. Ausências de diferenças na expressão da caderina-E entre HaCat e SCC9 (C). Nenhuma alteração para o perfil de metilação E-caderina foi observada com hipoxia (D). A análise estatística foi realizada através do teste pós Tukey. \* indica que a  $P < 0,05$ .



**Figura 2.** Efeito de CoCl<sub>2</sub> na migração na linha de células HaCat (A) e SCC9 (C). Nossos resultados mostraram uma redução significativa da área na linha de células HaCat (B) e SCC9 (D), e, conseqüentemente, uma maior migração de células no grupo submetido a hipóxia quando comparado com o grupo não tratado. A análise estatística foi realizada através do teste pós Tukey. A barra de escala é de 50  $\mu$ m. \* Indica que  $p < 0,05$ .

# 10<sup>IO</sup>

# FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA  
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE  
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Realização:



Apoio:

