



CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DA *Jodina rhombifolia* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MCF-7

SASSI, Juliana Saraçol^{1,2}; COSTA, Juliana Hartleben da^{1,2}; RIBEIRO, Samuel^{1,2}; SILVA, Viviane Maciel^{1,3}; OLIVEIRA, Isabel Oliveira de^{1,4}; DEL PINO, Francisco Augusto Burkert^{1,5}

¹Universidade Federal de Pelotas

²Graduanda de Licenciatura em Ciências Biológicas – IB/UFPel

³Mestranda em Química – PPGQ/UFPel

⁴Professora do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – IB/UFPel

⁵Professor do Departamento de Bioquímica – IQG/UFPel

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. ju_saracol@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais causadores de morte no Brasil e no mundo e a décima no ranking mundial entre as mulheres. É caracterizado pelo crescimento não programado e desordenado de células havendo um desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e a diferenciação celular. Para que se possam retardar os desenvolvimentos da neoplasia são necessários estudos detalhados para compreender cada uma das etapas da carcinogênese.

Os mecanismos que desencadeiam a morte celular são classificados segundo as características bioquímicas e morfológicas. A apoptose é a morte programada da célula, ou seja, um fenômeno rápido no qual diversos genes estão envolvidos.

O gene BCL2 é um promotor da sobrevivência celular, atua na inibição da apoptose apresentando genes reconhecidos como pró e apoptóticos. Outro gene importante é o p53 que atua como um supressor de tumor e é frequentemente mutado em todos os tipos de câncer humano. A proteína p53 é importante porque protege a célula impedindo que haja proliferação celular desordenada após um dano no DNA e ativando a apoptose quando o caso for irreparável. A interrupção do crescimento celular mediado por p53 resulta da transativação de p21 dependente de p53 (Machniewicz & Faucz, 2003).

Para determinar se a célula se prolifera ou se diferencia é essencial à proteína p21 porque é a reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular, que será codificada no cromossomo 6 (Schneider, 2007). Logo, esta transição é importante porque é na fase S que ocorre a replicação do DNA, uma das fases (Morantes et al., 2007).

Este estudo tem por objetivo avaliar se a apoptose é o mecanismo de ativação da morte celular que realmente está ocorrendo quando linhagens de células tumorais (MCF-7) são tratadas com extratos metanólicos da *Jodina rhombifolia Hook et Arn* que em outros estudos foi detectada como uma planta que possui uma atividade antiproliferativa frente a essa linhagem (Beira, 2000). Para isso foi necessário extrair RNAs celulares, com a finalidade de testar a ativação dos genes apoptóticos acima descritos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas duas linhagens celulares, uma de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e outra de fibroblastos saudáveis (NH/3T3) para realizar dois ensaios biológicos. As células foram extraídas com 1 mL da enzima Trypsina, centrifugadas e contadas em câmara de Neubauer.

Em seguida foram transferidas para placas de Petri de polietileno (60 mm) e semeadas 1×10^6 unidades de células e 5 mL de meio de cultivo (DMEM+SBF/ 9:1), deixadas em estufa com a atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas à 37 °C. Depois de haver aderência e proliferação foram adicionadas 100 µL dos extratos e mantidas por 48 horas na estufa de CO₂ a 5%.

As placas retiradas da estufa foram deixadas por 5 minutos em gelo, o meio de cultivo aspirado e as células, presentes nas placas, lavadas com 1 mL de PBS por duas vezes e inserido 1 mL de Trizol[®]. Logo, foram deixadas por 2 minutos em repouso e a seguir transferidas para tubos nos quais foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio PA, agitados por 15 segundos e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente.

A seguir foram centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos à 4°C formando um sistema trifásico que contém o RNA na fase intermediária, transferidos para novos tubos e precipitados com 0,5 ml de álcool isopropílico. Os tubos foram armazenados por 24 horas a -20°C.

Os tubos foram descongelados e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos à 4°C e observado a formação de um *pellet* incolor. O sobrenadante foi removido, os tubos virados ao inverso e secos a temperatura ambiente. O *pellet* seco foi lavado com álcool etílico 75%, centrifugados novamente a 7500 rpm por 5 minutos à 4°C. O *pellet* foi dissolvido com 1 mL de água e incubados por 10 minutos a 60°C. O RNA na amostra foi quantificado com diluição em água miliQ (1:500), realizadas duas leituras em espectrofotômetro para ácidos nucleicos (GeneQuant).

Foi utilizado o kit SuperScript[®] (Invitrogen) para a síntese de cDNA PE. Foram colocado 1 µl do RNA total das amostras e a mesma quantidade de RNA controle e adicionados 1 µl de dNTP 10mM, 1 µl dos primers e 10 µl de água deionizada tratada com DEPC e a mistura incubada por 5 minutos a 65 °C.

Aos tubos em gelo foram adicionados 9 µl da mistura RNA/primers (contendo 2 µL de buffer RT 10x, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0,1M e 1 µL de RNase out), centrifugados e incubados por 2 minutos a 42 °C, foi adicionado ainda 1 µl de SuperScript II RT, menos nos controles, 1 µl de água tratada com DEPC e incubado por 50 minutos a 42 °C. A reação foi mantida 15 minutos a 70 °C e transferida para gelo. Finalmente foi centrifugada, adicionado 1 µl de RNase H incubados os tubos por 20 minutos a 37 °, e armazenados a - 20 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No primeiro ensaio da extração de RNA (figura 1) foram utilizados os cDNAs em branco de ambas linhagens células, pode-se observar que o resultado foi positivo pois o gene P21 (gene supressor de tumor) e o BCL2 (promotor da sobrevivência celular) em ambas as linhagens foram expressos, embora de forma fraca.

O gene beta-actina foi escolhido porque é altamente conservado nas proteínas que estão envolvidas com a motilidade da célula, a estrutura e a integridade (Silva, 2008). A expressão do gene da beta-actina foi observada como positiva em 3 amostras pela presença do marcador na região de 100 pb.

O gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi o marcador melhor identificado (figura 1 e 2) em ambas às linhagens envolvidas em função da característica dele ser uma enzima envolvida na glicólise e conservadas nas espécies.

Na realização do segundo ensaio (figura 2) foram testados os cultivos de MCF-7 tratados com extratos metanólicos da *Jodina rhombifolia* e suas diluições. Em um gel de agarose 0,8% foram testados os RNAs extraídos no quais somente os do cultivo de MCF 7 tratados com o extrato 2 - diluição 10, extrato 14 – diluição 10 e 60 e os controles celulares estavam íntegros.

Logo, nos cDNAs dos cultivos acima citados foi possível observar a presença positiva dos marcadores GAPDH e beta-actina testados em MCF-7.

O gene P21 teve presença menos significativa nos cultivos tratados com os extratos MF210, MF1410 e MF1460 do que nos controles. Já o gene BCL2 teve presença mais significativa nos cultivos tratados com os extratos MF210, MF1410 e MC. O gene BCL2 atua como um inibidor apoptótico do metabolismo celular (Duarte et al., 2005). Logo, podemos considerar que apenas este extrato, MF1410 estaria menos ativo desencadeando um processo apoptótico.

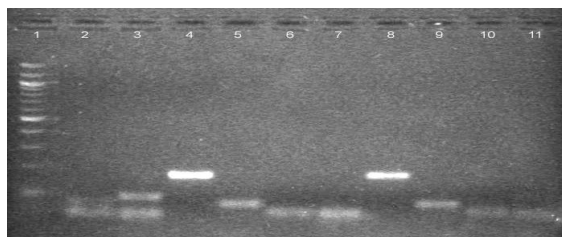


Figura 01: PCR em gel de agarose dos cultivos controle de MCF-7, 3T3 e controle do kit.

- | | |
|-----------------------|--------------------------|
| 1 – Marcador | 7 – 3T3 BCL2 |
| 2 – MCF-7 P21 | 8 – 3T3 GAPDH |
| 3 – MCF-7 BCL2 | 9 – 3T3 beta actina |
| 4 – MCF-7 GAPDH | 10 – Control GAPDH |
| 5 – MCF-7 beta-actina | 11 – Control beta-actina |
| 6 – 3T3 P21 | |

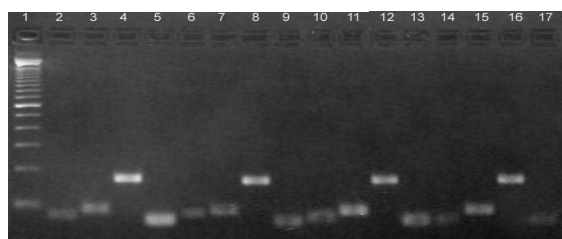


Figura 02: PCR em gel de agarose dos cultivos de MCF-7, tratados com as diluições dos extratos de *Jodina rhombifolia*

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1 – Marcador | 9 – MF1410 beta actina |
| 2 – MF210 P21 | 10 – MF1460 P21 |
| 3 – MF210 BCL2 | 11 – MF1460 BCL2 |
| 4 – MF210 GAPDH | 12 – MF1460 GAPDH |
| 5 – MF210 beta-actina | 13 – MF1460 beta actina |
| 6 – MF1410 P21 | 14 – MC P21 |
| 7 – MF1410 BCL2 | 15 – MC BCL2 |
| 8 – MF1410 GAPDH | 16 – MC GAPDH |
| | 17 – MC beta actina |

4. CONCLUSÕES

O isolamento do RNAm nas células da linhagem de MCF-7 dos genes p21 e BCL2 permitiu concluir que não houve a ativação desse mecanismo, nas concentrações aplicadas dos extratos 2 e 14.

Assim, são necessários maiores estudos para reavaliarmos quais seriam as possíveis causas da atividade dos extratos testados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEIRA, F. T. A. **Evaluación de la Actividad Antineoplásica de Extractos de la Planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.** Barcelona, 2000. 17 p. Tese de Doutorado, Universidade de Barcelona, 2000.
- DUARTE, R. D; FURTADO, A. A; LERMEN JR, A; BORGES, L; CARVALHO, E. M; NEVES, H. Z; DUARTE FILHO, D. L; DUARTE, D. L; Lesões Mamárias Incomuns: Ensaio Iconográfico. **Instituto Brasileiro de Radiologia**, volume 38, suplemento 5, 2005, p. 371.
- MACHNIEWICZ, P. H; FAUCZ, F. R. Associação de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Volume 31, suplemento 6, 2003, p. 31.
- MORANTES, J; PRIETO, C; LINHARES, E; RINCON, J; ARISTIZÁBAL, F; Análisis fitoquímico y de actividad biológica del musgo *Polytrichum juniperinum*. **Revista da Academia Colombiana de Ciências**, volume 31, suplemento 121, 2007, p. 473.

SCHNEIDER, L; **Expressão Gênica e Protéica de P53 e P21 em Fibroadenoma e Tecido Mamário Normal Adjacente**. Porto Alegre, 2007. 10 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.