



ANÁLISE DO EFEITO DA EPIGALOCATEQUINA-3-O-GALATO (EGCG) NA TRANSCRIÇÃO DOS GENES DO COLÁGENO TIPO I E FIBRAS ELÁSTICAS EM FIBROBLASTOS: ESTUDO PILOTO

Palavras-Chave: EGCG, EPIGENÉTICA, DESMETILAÇÃO

Autores(as): GABRIELLA DIAS BUENO MARTINS

Co-autores: VITOR MARINHO DA COSTA

Orientador (a): PROF^a. DR^a. ANA PAULA DE SOUZA

INTRODUÇÃO:

As catequinas são o princípio ativo mais abundante no chá verde, havendo muitos relatos na literatura científica a respeito dos efeitos dessas moléculas que pertencem à classe dos polifenóis na metilação do DNA e nas modificações epigenéticas em histonas (Bouayhya et al. 2022). De acordo com estudos prévios, as moléculas da família das catequinas possuem ação inibidora sobre enzimas que modificam epigeneticamente a cromatina, como as DNA metiltransferases (DNMTs), particularmente a DNMT-1 que representa a enzima responsável pela metilação de sítios CpG na replicação do DNA, histonas acetilases, e histonas desacetilases.

A ação inibitória das catequinas sobre enzimas que modificam as marcas epigenéticas é dose-dependente, sendo a epigalocatequina-3-O-galato (EGCG) a catequina presente no chá verde com o maior potencial inibidor de DNMT, chegando a ser considerada uma epidroga por alguns pesquisadores. De acordo com Zhang et al., EGCG poderia re-sensibilizar células de câncer de pulmão NSCLC à cisplatina como induzir significativa redução da proliferação celular, incluindo aumento de apoptose celular, quando EGCG foi combinada à cisplatina. O efeito de EGCG como um inibidor de DNMT é comparado ao efeito do nucleosídeo análogo 5-aza-CdR, um bem caracterizado e conhecido inibidor de DNMT.

O potencial uso tópico e cosmético de EGCG também vêm sendo investigado. Mittal et al. estudaramo uso de EGCG em formulação tendo como veículo um gel-creme hidrofílico e observaram que a EGCG atua como um excepcional fotoprotetor, podendo ser capaz de proteger contra a fotocarcinogênese por meio da proteção contra alterações do padrão de metilação do DNA quando utilizado em dose de 1mg/cm² de superfície de pele.

Frente diversos relatos sobre o papel da catequinas na inibição de DNMT o que poderia beneficiar o aumento de expressão de diversas proteínas cujo gene pode se tornar silenciado devido ao processo de metilação do DNA, como os genes do colágeno tipo I e os genes de outras proteínas de matriz extracelular (ECM) como as proteínas das fibras elásticas, e como há interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de fármacos e fórmulas tópicos que possam aumentar a expressão dessas proteínas de matriz extracelular, o objetivo desta pesquisa é submeter uma linhagem primária de fibroblastos gengivais ao tratamento com EGCG em diferentes concentrações e por diferentes períodos de tempo, para posterior isolamento do RNA total e a expressão dos genes COL1A/COL2A/EN/FBN1, genes que codificam proteínas do sistema de Fibras Colágenas e Fibras Elásticas da ECM, respectivamente, esperando observar os resultados as diferentes concentrações e tempo de tratamento.

METODOLOGIA:

1. Cultivo e Ensaio de Proliferação e Viabilidade Celular

A priori, fibroblastos primários foram previamente submetidas a testes laboratoriais a fim de verificar e garantir sua estabilidade durante toda a Pesquisa. Uma vez que se certificou da viabilidade das células, estas foram cultivadas em meio Low Serum Growth Supplement (LSGS), contendo: soro fetal bovino, fatores básicos de crescimento de fibroblastos, heparina, hidrocortisona, fator de crescimento epidermal, em condições de cultivo a 5% CO₂ e 37°C, sendo plaqueadas e cultivadas em placas de cultura com 6 cm e, acompanhadas diariamente certificando-se da esterilidade do meio e crescimento das células. A cada 48 horas realizou-se trocas do meio de cultura até que se tivesse 70% de confluência na placa, o que levou aproximadamente 7 dias.

Posteriormente, os fibroblastos foram coletados por tripsinização e contados em câmara de Neubauer, calculou-se a quantidade de células, obtendo cerca de 1×10^4 células em toda solução. Utilizando um placa de 96 poços, realizou-se o teste do MTT, um teste colorimétrico para a determinação da citotoxicidade de agentes químicos para as células, tal teste quantifica o dano induzido por um agente no metabolismo celular de glicídeos, pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, é então quantificada pela redução do MTT a formazan, pela atividade das enzimas desidrogenases. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular, podendo assim avaliar a viabilidade através de um espectrofotômetro de microplacas (Mosmann, 1983).

Para ensaio do MTT, utilizou-se 4 placa de 96 poços, sendo usados 42 poços por placa, divididos em 3 fileiras de tratamento devidamente duplicadas (6 fileiras), sendo dois grupo controle (7 poços), dois controle negativo com TRITON (7 poços) e 2 últimos grupo foi tratado com 5-Aza-2'-Desoxicitidina, o qual é um inibidor de DNA-metiltransferase que demonstrou alterar a expressão gênica em estudos prévios sendo seus efeitos comparados aos efeitos esperados para ação de EGCG. Foram Semeadas cerca 1×10^4 células viáveis/poço em 200 µL de meio DMEM completo, em seguida, os fibroblastos foram levados para estufa nas condições de manutenção de cultivo das células por 48 horas, para adesão celular e estabilização, as células foram submetidas ao meio decarenciamento (livre de SBF), com o objetivo de evitar a interferência dos fatores de crescimento do soro na proliferação celular.

O primeiro ensaio de MTT foi realizado após 3 dias após o tratamento com 5-AZA, adicionando-se 100 µL de MTT a 0,3 mg/mL (solução preparada previamente em meio DMEM completo) por poço, a placa foi levada a incubadora por 3 horas nas condições de cultivo requeridas pelas célula (37 °C e 5% CO₂). Decorridas as 3 horas de incubação realizou-se a Redução do MTT a formazan evitando possíveis perdas de célula adicionando 100 µL de álcool absoluto por poço. Por fim, a leitura de absorbância da placa em espectrofotômetro de microplacas.

O ensaio mencionado foi realizado ainda outras 3 vezes em dias posteriores, totalizando 4 ensaios de viabilidade, os quais foram realizados no 3° dia de tratamento, 6° dia de tratamento, 9° dia de tratamento e 12° dia de tratamento. A leitura de absorbância final bem como a viabilidade celular após o tratamento está resumida na tabela 1 apresentada abaixo.

ABSORBÂNCIA (MEDIANA)				
	Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12
Controle	0,20	0,26	0,62	0,61
5-AZA	0,21	0,31	0,35	0,33

Tabela 1 Mediana dos níveis de absorbância observados após cada ensaio de viabilidade celular (MTT) para células tratadas com 5-AZA e não tratadas.

Posteriormente, as células foram cultivadas novamente em condições ideais que permitem seu crescimento e viabilidade e após atingir cerca de 1×10^6 foram coletadas por tripsinização e plaqueadas em duas placas de cultivo contendo 96 poços, dos quais utilizou-se 8 poços (1 fileira) para controle negativo, tratando as células com trinton, 16 poços (2 fileiras) para grupo controle, sendo cada um relativo a uma concentração de EGCG. Por fim, mais duas fileiras de poços da placa (16 poços) foram usadas para o tratamento com EGCG, onde 8 poços cada um recebendo cerca de 4×10^4 foram tratados com 25 µM de EGCG em veículo tampão salino-fosfato (PBS) e outros 8 poços da placa recebeu 50 µM de EGCG. Ambos foram tratados por 48 horas e o ensaio de viabilidade celular foi realizado novamente para que seja avaliada a viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular dos fibroblastos diante do tratamento com EGCG para posterior comparação.

A leitura de absorbância final bem como a viabilidade celular após o tratamento está resumida na tabela 2 apresentada abaixo:

	Controle	Tratamento (25uM)	Controle	Tratamento (50 uM)
24 horas pós careciamento	0,46	0,55	0,55	0,46
48 horas pós careciamento	0,91	0,97	0,8	0,71

Tabela 2. Média dos níveis de absorvância observados após tratamento dos fibroblastos com diferentes concentrações de EGCG

2. Purificação do RNA total

Feitos os ensaios de viabilidade e identificado o comportamento das células diante do tratamento com a epigalocatequina-3-o-galato, será realizada a purificação do RNA total utilizando o protocolo do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsband, CA, USA). A qualidade e quantidade dos ácidos nucleicos purificados será analisa em aparelho Nanodrop.

3. Análise de Expressão dos mRNA

Para análise de expressão de mRNA e avaliação do efeito da epigalocatequina-3-o-galato (egcg) na transcrição dos genes do colágeno tipo I e fibras elásticas em fibroblastos, será realizada transcrição reversa onde 1µg do RNA total será submetido ao tratamento com DNase I Amplification Grade (Invitrogen Carlsband, CA), segundo protocolo do fabricante.

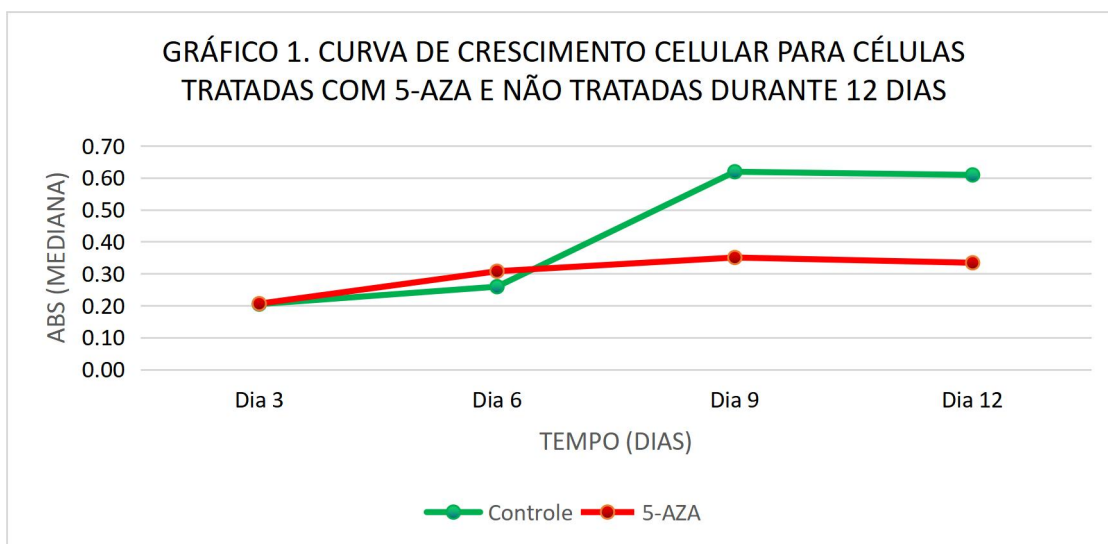
Para tanto, 1 µg de RNA será dissolvido em volume final de 8µl contendo 1µl de tampão e 1µl da enzima DNase. Após 15 minutos de incubação a 37°C será adicionado 1µl de EDTA e as amostras serão incubadas por 10 minutos a 70°C para a inativação da enzima DNase. O DNA complementar (cDNA) será sintetizado após reação de transcrição reversa utilizando o kit Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Carlsband, CA), contendo 500ng de RNA em volume final de reação de 20µl.

Em seguida, a análise quantitativa da expressão do transcritos gênicos será realizada em reações de PCR quantitativo (QPCR) utilizando o sistema SYBRGreen. Os primers para amplificação dos fragmentos serão criados a partir de seqüências de mRNA para os genes alvos depositadas no GenBank. As reações de QPCR serão padronizadas individualmente para cada set de primers utilizando os reagentes do sistema Fast-Start DNA Master Plus SYBR Green kit (Roche Diagnostic Co.).

Durante a padronização, os produtos de amplificação também serão submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em comparação a padrões de massa molecular, para análise de presença ou ausência de bandas inespecíficas. O gene interno calibrador utilizado será GAPDH e os resultados serão apresentados como a razão da expressão do mRNA gene analisado/GAPDH utilizando o método Cycle Threshold (Ct).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

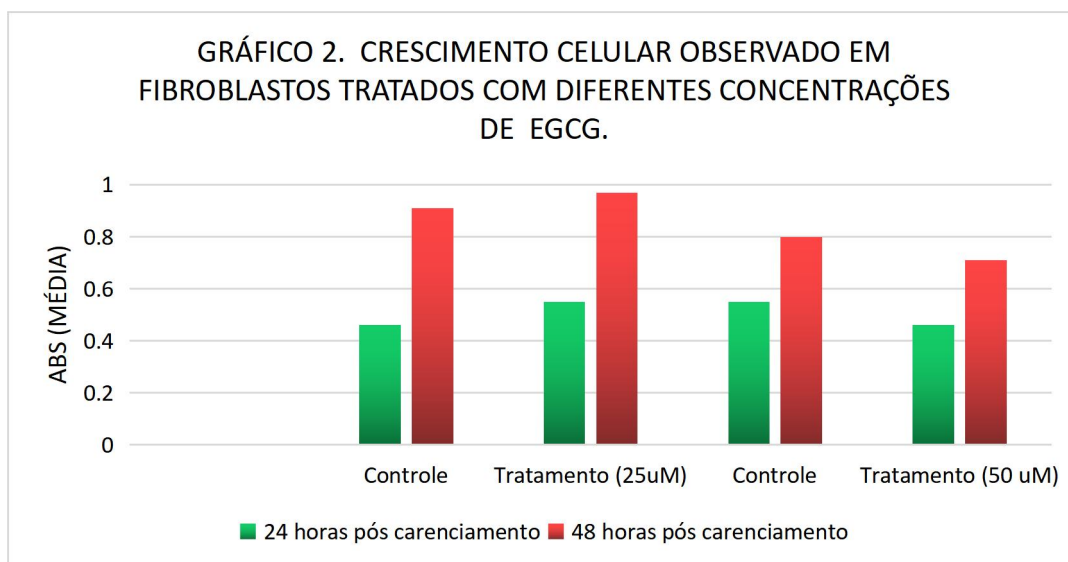
A priori, os ensaios de citotoxicidade e viabilidade realizados com as células revelam resistência dos fibroblastos ao 5-AZA, assim, a substância nas dose usadas nessa pesquisa não é tóxica para células. Todavia, ao avaliar a curva de crescimento (Gráfico 1) observa-se que houve um declínio na curva de crescimento das células que foram tratadas com 5-AZA, o que representa uma diminuição no crescimento celular o que sugere que a droga interfere no ciclo celular através de mecanismos epigenéticos o que diminui o padrão de crescimento celular. Tal hipótese deve ser melhor avaliada através da análise de expressão de mRNA possibilitando avaliar de fato os efeitos da droga sobre a transcrição gênica.



Ao avaliar perfil de crescimento celular de fibroblastos tratados com diferentes concentrações de EGCG (25 μ M e 50 μ M), observa-se que a droga apresenta impacto positivo no padrão de crescimento dessas células, não sendo tóxica para essa.

O Gráfico 2 mostra que para a menor concentração (25 μ M) de EGCG, houve significativo aumento na média de absorvância em relação ao grupo controle e conseqüentemente maior quantidade de células viáveis, o que sugere que a droga nessa concentração interfere positivamente no ciclo celular aumento a taxa de crescimento celular.

Já na maior concentração (50 μ M), apesar de observar aumento da média de absorvância em relação ao 1º dia, observa-se que esse valor ainda é menor que obtido para o grupo controle. Assim destaca-se ainda que há uma relação inversamente proporcional entre concentração da droga e crescimento celular, de modo que quanto maior a concentração usada, menor foi absorvância obtida e conseqüentemente menor a concentração celular presente



A expressão diferencial dos transcritos gênicos entre as células controle tratadas com ddH₂O e as células tratadas com EGCG será avaliada utilizando o teste de teste Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

CONCLUSÕES

A presença de 5-AZA (inibidora da ação de DNMTs) mostrou-se relacionada a diminuição do crescimento celular quando comparado a um grupo controle pelo teste de viabilidade celular, não sendo tóxica nas concentrações usadas.

Com relação ao EGCG, os ensaios de citotoxicidade mostram que as diferentes concentrações da droga apresenta impacto diferente sobre o ciclo celular, onde os grupos tratados com a menor concentração da

droga mostrou expressivo aumento na quantidade de células quando compara com grupos não tratados ou tratados com maior concentração da mesma droga

Espera-se observar um aumento da síntese de mRNA da proteínas de matriz extracelular devido ao seu potencial desmetilante, sugerindo uma ação moduladora na hipermetilação do DNA, ação que pode ser de interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de fármacos e fórmulas tópicas que possam aumentar a expressão dessas proteínas de matriz extracelular.

BIBLIOGRAFIA

Bouyahya A, Mechchate H, Oumeslakht L, et al. The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. *Biomolecules* 2022; (12), 10.3390/biom12030367.

Mital A, Piyathilake C, Hara Y, Katiya SK. Exceptionally High Protection of Photocarcinogenesis by Topical Application of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate in Hydrophilic Cream in SKH-1 Hairless Mouse Model: Relationship to Inhibition of UVB-Induced Global DNA Hypomethylation. *Neoplasia* 2003; (5), 555 – 565.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

Zhang Y, Wang X, Han L, et al. Sun Green tea polyphenol EGCG reverse cisplatin resistance of A549/DDP cell line through candidate genes demethylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2015; (69), 285-290