

ANÁLISE DO EFEITO DA EPIGALOCATEQUINA-3-O-GALATO (EGCG) NA TRANSCRIÇÃO DOS GENES MMP-1, MMP-2 e MMP-3

Palavras-Chave: METALOPROTEINASE, EGCG, EPIGENÉTICA

Autores(as): GABRIELLA DIAS BUENO MARTINS

Co-autores: VITOR MARINHO DA COSTA

Orientador: Prof^a. Dr^a. ANA PAULA DE SOUZA

INTRODUÇÃO

As modificações epigenéticas, mecanismos amplamente estudados afetam diretamente o DNA e se referem às alterações herdáveis durante a divisão celular, na expressão dos genes e na estrutura da cromatina que ocorrem sem uma alteração física na sequência do DNA. Estes mecanismos herdáveis e reversíveis são críticos no desenvolvimento normal e crescimento celular. As alterações epigenéticas envolvem modificações na estrutura da cromatina, estado de metilação do DNA, acetilação de histonas e regulação de RNA não codificantes (ncRNA). (MAIA; et al, 2020). Essas modificações criam a “paisagem epigenética”, permitindo que o genoma exiba propriedades e padrões de distribuição únicos em diferentes tipos de células para sua identidade celular.

A metilação do DNA consiste na mais mecanicamente compreendida modificação epigenética. As enzimas que moldam os padrões de metilação do DNA são as DNA metiltransferases (DNMTs), essas são responsáveis por inserir na posição C5 do resíduo de citosina, um grupo metil (5mC). A metilação é considerada uma marca epigenética, todavia, pode ser removida como consequência de processos de desmetilação estável, essa perda pode ser resultado da replicação sucessiva ou por regulação negativa de DNMT. Há estudos diversos que sugerem que os mecanismos epigenéticos como responsáveis pela progressão do processo de envelhecimento, além de sua relação com processos patogênicos diversos através da ativação e desativação de genes importantes para homeostase (Bouyahya, 2022).

O chá verde constitui um tipo de apresentação comercial das folhas da *Camellia sinensis*. Consumido predominantemente na China, Japão, Índia e países do norte da África, tem história antiga usada em ritos cerimoniais, refeições e para fins medicinais. Seu uso farmacológico foi introduzido no mercado como auxiliar de regimes dietéticos, e, hoje vem sendo estudados seus efeitos no combate do envelhecimento celular normal e induzido por radiação ultravioleta e na prevenção e tratamento do câncer. (Shin, 2006)

Tendo em vista esse contexto, é crescente o interesseira indústria farmacológica pelos polifenóis presentes na planta, uma vez que, apresentam inúmeras propriedades biológicas, com destaque para a epigalocatequina(3)galato (EGCG), que mostrou ter propriedades antioxidantes, contribuindo para sua utilidade terapêutica no que se refere a proteção contra patologias diversas, como o câncer e aquelas relacionadas ao envelhecimento, tornando interessante sua utilização em formulações tópicas. Ademais, outras atividades têm sido relatadas incluindo ação antiinflamatória, antibacteriana, imunoestimulante, anti-alérgica e antiviral.

Destaca-se que a degradação da matriz do conjuntivo é feita por um grupo de enzimas proteolíticas chamadas de metaloproteinases (possuem átomos de zinco) que são sintetizadas pelas células do conjuntivo e inflamatórias. Essas enzimas estão envolvidas em vários processos fisiológicos, incluindo remodelação tecidual e degradação de proteínas na matriz extracelular. As MMPs desempenham um papel regulador na proliferação, migração e diferenciação celular. Além disso, eles estão envolvidos em processos cruciais como apoptose, angiogênese, reparo tecidual e resposta imune. (Navarro et al, 2006)

Ademais, a degradação da matriz extracelular (MEC) por MMPs e o aumento da expressão de MMPs em células cancerígenas e células endoteliais microvasculares tumorais tornam as MMPs um alvo atraente para o câncer, bem como para estudos de prevenção e terapia da patologia. (Roomi et al, 2014)

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito da epigalocatequina-3-O-galato na expressão dos genes de metaloproteinases (MMPs), com destaque para os tipos MMP-1, MMP-2 e MMP-3, em fibroblastos de derme normais após tratamento com concentrações variadas do polifenol EGCG.

METODOLOGIA

1. Cultura Celular

Diante da aquisição dos reagentes utilizados para os testes, as células escolhidas para essa pesquisa (fibroblastos) de linhagem específica pesquisa foram devidamente testadas, a fim de conhecer seu padrão de crescimento e condições ideais de cultivo, para assim garantir manutenção da viabilidade celular e resultados mais confiáveis ao final da análise. Vale destacar que a linhagem escolhida não são modificadas por material genético viral.

Uma vez certificada a viabilidade das células e tendo ciência das condições de manutenção, os fibroblastos foram cultivadas em meio Low Serum Growth Supplement (LSGS) - meio completo, contendo: soro fetal bovino, rico em fatores de crescimento que induzem a proliferação e fatores de adesão que são responsáveis pela adesão celular ao substrato (placa) e que levam a aderência das células, 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.

Tendo feito isso, as células agora em cultura foram acompanhadas diariamente certificando-se da esterilidade do meio e crescimento. A cada 48 horas realizou-se trocas do meio de cultura até que se tivesse 70% de confluência na placa, o que foi observado com auxílio de microscópio óptico invertido após aproximadamente 7 dias após o cultivo.

Com a placa de Petri tendo ~70% da superfície ocupada pelos fibroblastos, estes foram coletados por tripsinização e contados com auxílio de câmara de Neubauer, para padronizar a contagem, foram excluídas as células dispostas sobre o limite superior e direito de cada quadrante. A contagem foi feita considerando 8 quadrantes da câmara, ao final obteve-se cerca de 1×10^6 células em toda solução (10 mL).

2. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A partir do cenário supramencionado, os fibroblastos foram submetidos ao tratamento com a epigalocatequina-3-O-galato (EGCG) em três diferentes concentrações (15 uM, 30uM e 60 uM), essas foram selecionadas de acordo com os achados na literatura científica.

Para certificação de que a droga estudada não era tóxica para as células usadas na pesquisa, realizou-se o ensaio de viabilidade celular, teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina), 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 o ensaio do MTT, as 1×10^6 coletadas por tripsinização previamente foram plaqueadas em duas micro-placas de cultivo cada uma contendo 96 poços, para fins didáticos as placas foram nomeadas de A à B (A, B).

De cada placa, utilizou-se 8 poços (1 fileira) para controle negativo, tratando as células com triton, 24 poços (3 fileiras) para grupo controle, sendo cada fileira relativo ao controle para as diferentes concentração de EGCG trabalhadas, por fim 8 poços (1 fileira) recebeu o tratamento com 15 uM de EGCG veículo tampão salino-fosfato (PBS), outros 8 poços (1 fileira) recebeu o tratamento com 30 uM da mesma droga no mesmo veículo e outros 8 poços da placa contendo fibroblastos recebeu tratamento com EGCG em uma concentração de 60 uM. Cada poço usado (controle, controle negativo e tratamento) recebeu cerca de 4×10^4 , quantidade de células satisfatória para avaliação do nível de absorvância por poço se as células estiverem em condições de viabilidade.

Após o plaqueamento, os fibroblastos foram analisados diariamente com auxílio de microscópio invertido, no 3° dia após o plaqueamento, foi feito o carenciamento visando à parada do ciclo celular

na transição G1/S, e, após 24 horas (4º dia), as células da placa B foram tratadas com EGCG e o ensaio de MTT feito para a placa A.

Passadas 48 horas de tratamento e o ensaio de viabilidade celular foi realizado novamente, agora para a placa B, para que seja avaliada a viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular dos fibroblastos diante do tratamento com EGCG nas concentrações trabalhadas (15 µM, 30 µM e 50 µM).

A leitura de absorbância foi feita com auxílio de um espectrômetro e os valores resumidos em mediana. De modo geral, os resultados revelam a viabilidade celular após o tratamento em diferentes concentrações, isso é, através do ensaio de MTT verificou-se que nessas concentrações a droga não é tóxica para as células e vale sua consideração para análise de seu efeito sobre a expressão de RNA.

3. Isolamento do RNA total

Uma vez que, os ensaios de viabilidade celular (MTT) foram concluídos e identificado o comportamento das células diante do tratamento com a epigallocatequina-3-o-galato (EGCG) e certificando-se de sua não toxicidade na concentração trabalhada, foi realizada a purificação do RNA total utilizando o protocolo do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsband, CA, USA). A preparação do RNA total isola todo o RNA em uma célula, incluindo RNA de transferência (tRNA), RNA ribossômico (rRNA), RNA mensageiro (mRNA) e micro RNA (miRNA ou microRNA). Vale destacar que para trabalhar com

Posteriormente, a qualidade e quantidade do material genético foi verificada em aparelho nanodrop. O sistema de retenção citado utiliza a tensão superficial para posicionar a amostra entre duas fibras ópticas permitindo a medição de amostras altamente concentradas, sem a necessidade de diluições com alta reprodutibilidade e precisão.

4. Análise de Expressão de mRNA

Para análise de expressão de mRNA e avaliação do efeito da epigallocatequina-3-o-galato (EGCG) na transcrição dos genes de MMP-1, MMP-2, MMP-3 em fibroblastos, foi realizada transcrição reversa, onde 1 µg do RNA total purificado previamente, foi submetido ao tratamento com DNase I Amplification Grade (Invitrogen Carlsband, CA), segundo protocolo do fabricante.

Nesse processo, a quantidade dos ácidos nucleicos purificados foi analisada em aparelho Nanodrop novamente, permitindo a quantificação do material genético em pequenas amostras com alta precisão. Tal feito permitiu a padronização da massa do material genético para todas as amostras variando apenas o volume, considerando que para amplificação é necessário 1 µg de RNA de cada amostra. Esta padronização da massa é fundamental para análise dos resultados uma vez que permite realizar comparações dos resultados após amplificação.

Feito isso, 1 µg de RNA (volume amostral obtido a partir da quantificação) foi diluído em volume final de 10 µl contendo 1 µl de tampão e 1 µl da enzima DNase, RNA em volume variável por amostra e água. Após 10 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 1 µl de EDTA, somando 11 µl e as amostras incubadas por 10 minutos a 70°C para a inativação da enzima DNase.

Em seguida, foi realizado a reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA), para isso, foi utilizado o kit Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix onde template de RNA foi combinado com 1 µL de Oligo d(T) e 1 µL de dNTP e após um mix em mini-centrifuga, levado ao termociclador a 65°C por 5 minutos, nesse momento o primer se liga a cauda Poli-A presente na extremidade do RNA mensageiro. Posteriormente, novos reagentes são adicionados, incluindo, a transcriptase reversa, além de um inibidor de RNase para inativação da enzima, buffer e tampão. Após um mix em mini-centrifuga, novamente os microtubos tipo eppendorf são levados ao termociclador a 55° por 10 minutos e em seguida a 85° por mais 10 minutos.

Os primers para amplificação dos fragmentos foram criados a partir de seqüências de mRNA para os genes alvos depositadas no GenBank. As reações de QPCR foram padronizadas individualmente para cada set de primers utilizando os reagentes do sistema Fast-Start DNA Master Plus SYBR Green kit (Roche Diagnostic Co.).

Ademais para garantir a confiabilidade dos resultados fez se necessário a determinação da temperatura específica para anelamento dos primers, para isso, a reação de PCR foi realizada considerando um gradiente de temperaturas próximas a 60° C. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose, esse permitiu a separação de moléculas carregadas em um campo elétrico e análise os padrões das bandas de DNA amplificado, permitindo identificar a melhor

temperatura para anelamento dos primers usados, para que essa então seja transferida para o aparelho de PCR em tempo real.

Em seguida, a análise quantitativa da expressão de transcritos gênicos está sendo realizada em reações de PCR quantitativo (QPCR) utilizando o sistema SYBR Green um corante específico para ácidos nucleicos. Durante cada fase da síntese de DNA, o corante SYBR Green I, que é incluído na mistura de reação, liga-se aos produtos de PCR amplificados, assim o amplicon pode ser detectado por sua fluorescência pela máquina de PCR em tempo real.

Primordialmente, a reação de PCR quantitativo foi realizada para um gene de referência, normalizador de dados, para esse estudo, foi escolhido o gene GAPDH que possui expressão significativa no tecido de forma invariável em todas as condições experimentais. Em seguida, a pesquisa segue em fase experimental e a reação de PCR para análise a expressão dos genes de MMP1, MMP2, MMP3 ainda serão realizadas.

Neste mesmo cenário de testes, foi realizada reação de PCR para análise de expressão de MMP2 usando outra linhagem celular de fibroblastos (GM-637), essa modificada por Vírus e imortalizadas, os resultados são interessantes para discussão, todavia, espera-se analisar a expressão desse mesmo gene considerando a linhagem CCD-1072SK, fibroblastos de derme não imortalizados e mais próximos de um cenário real humano.

Há expectativa para que os resultados sejam obtidos e finalizados em breve e a conclusão seja melhor consolidada para abertura de melhor discussão dos tópicos dessa pesquisa.

RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

Os resultados parciais desse estudo revelam que a droga nas concentrações consideradas para análise não é tóxica para os fibroblastos, sendo concentrações seguras o que permitiu sequência as análises para assim avaliar seus efeitos na expressão de RNAm dos 3 tipos de MMP estudados. Cabe destacar que a não toxicidade não significa que os efeitos sobre a expressão gênica serão positivos para a saúde, sendo indispensável essa análise para conclusões. Sabe-se que nas concentrações estudadas a droga é segura e pode ser considerada industria farmacêutica e cosmética em um futuro, caso os resultados sejam positivos.

Ao avaliar resultados parciais do estudo e a expressão do gene de MMP2 por fibroblastos modificados (GM637), observou-se que para as amostras tratadas com menor quantidade da droga, não há efeito positivo ou negativo sobre a expressão de MMP-2. Por outro lado, o tratamento com a dose aumentada leva ao aumento do nível de expressão de mRNA da MMP-2. Vale destacar que a linhagem mencionada trata-se de células imortalizadas e modificadas por vírus.

Espera-se repetir os resultados considerando a linhagem de fibroblastos CCD-1072SK, essa por sua vez sem modificação e mais próximas de um cenário real de célula humana. Busca-se comparar os resultados da expressão dos 3 genes de MMP, buscando diferença no padrão de expressão entre os 3 tipos e para as diferentes concentrações de EGCG. Há expectativa de resultados positivos e que possam ser considerados para a homeostase, controle e tratamento de patologias e alterações funcionais significativas que assolam os indivíduos, uma vez que MMPs exercem uma variedade de atividades biológicas e estão presentes no organismo saudável, todavia, estão envolvidas em várias doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, inflamação e distúrbios cerebrais e possuem antagonismos em patologias relacionadas ao envelhecimento quando a produção está aumentada.

CONCLUSÕES

Estudos revelam que as metaloproteinases de matriz (MMPs) desempenham papéis essenciais na invasão tumoral por meio da degradação das membranas basais e da matriz extracelular (MEC). Além disso, essas enzimas tem protagonismo em outros cenários patológicos. Seu papel no equilíbrio corporal em condições de saúde também não pode ser descartado, desenvolvendo uma série de atividades biológicas importantes, estando envolvidas na renovação do colágeno da membrana basal em condições basais e de outras proteínas da matriz durante a angiogênese, remodelação e reparo do tecido.

Os estudos que vem sendo realizados por nosso grupo de pesquisa buscam mostrar os o efeito da EGCG sobre metaloproteinases de matriz (MMP-1, MMP-2, MMP-3). Se os resultados forem positivos e as MMPs forem sensíveis as doses de EGCG poderemos ter resultados significativos para a saúde que poderão ser aplicáveis para a industria farmaceutica , cosmética e diferentes áreas da

saúde no controle, prevenção e tratamento de diferentes patologias. Os resultados encontrados na literatura são favoráveis, quando se trata dessa epigalocatequina, busca-se ir de encontro aos achados.

É notório que para consolidar as conclusões e caracterizar as interações entre os polifenóis potentes como EGCG e MMPs que levam à inibição ou ativação de suas atividades faz-se necessário terminar a fase experimental e análise dos dados obtidos.

BIBLIOGRAFIA

Bouyahya, A.; Mechchate, H.; Oumeslakht, L.; Zeouk, I.; Aboulaghras, S.; Balahbib, A.; Zengin, G.; Kamal, M.A.; Gallo, M.; Montesano, D.; 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, 367.

Maia, Maria de Mascena Diniz, and Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva. "Conceitos básicos de epigenética para universitários." *Recife: EDUFRPE* (2020).

Mosmann, Tim. "Ensaio colorimétrico rápido para crescimento e sobrevivência celular: aplicação em ensaios de proliferação e citotoxicidade." *Journal of immunological methods* 65.1-2 (1983): 55-63.

Roomi, M. W., et al. "Comparative effects of EGCG, green tea and a nutrient mixture on the patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in cancer cell lines." *Oncology reports* 24.3 (2010): 747-757.

Navarro, V. P., et al. "The participation of matrix metalloproteinases in the physiopathological processes of the oral cavity [Article in Portuguese]." *Rev Odontol UNESP* 35.4 (2006): 233-238.

Shin, Hyun-Jung, et al. "Effect of green tea catechins on the expression and activity of MMPs and type I procollagen synthesis in human dermal fibroblasts." *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* 32.2 (2006): 117-121.