

Efeito da proteína catiônica eosinofílica em linhagens celulares derivadas de carcinomas espinocelulares bucais humanos

LIMA PO¹, SANTOS FV¹, OLIVEIRA DT², PEREIRA MC¹

RESUMO

A função dos eosinófilos nas neoplasias malignas continua obscura. Sugere-se que exerçam uma atividade antitumoral, correlacionada com a secreção de suas proteínas, especialmente a proteína catiônica eosinofílica (ECP). O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da ECP sobre a viabilidade das linhagens SCC-4 (CRL-1624) e SCC-25 (CRL-1628), através do teste do MTT [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo]. As células foram incubadas com diferentes concentrações de ECP por 72 horas. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para avaliação da viabilidade celular foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Para a SCC-4, não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados e o controle. Observou-se uma diminuição significativa na viabilidade da linhagem SCC-25, quando incubada com 10uM de ECP. Conclui-se que a proteína apresentou efeito citotóxico somente para a linhagem SCC-25, sugerindo que sua citotoxicidade dependa do tipo celular e de seu potencial proliferativo.

Palavras-chave: **proteína catiônica eosinofílica, atividade citotóxica, eosinófilos, carcinoma espinocelular bucal.**

INTRODUÇÃO

A proteína catiônica eosinofílica (ECP) representa uma das principais proteínas presentes nos grânulos específicos dos eosinófilos (EOS). Por apresentar homologia com a superfamília ribonuclease A, uma família de

enzimas vertebrado-específica composta por outras oito proteínas que conservam os mesmos resíduos de aminoácidos nos seus sítios ativos, a ECP também é denominada de 'ribonuclease 3' (RNase 3)^{1; 2; 3}.

A ECP apresenta diversas atividades biológicas, incluindo a supressão da resposta proliferativa das células T e a síntese de imunoglobulinas por células B, degranulação de mastócitos, a regulação das atividades dos fibroblastos, a indução da secreção de muco pelas vias aéreas e interação com os sistemas de coagulação e do complemento⁴. Contudo, destaca-se a sua atividade citotóxica para vírus, bactérias, parasitas, células epiteliais respiratórias e linhagens celulares tumorais¹.

Apesar do mecanismo responsável pelo seu efeito citotóxico não ser totalmente compreendido, sugere-se que a ECP crie poros nas membranas celulares, por meio da desestruturação da bicamada fosfolipídica, permitindo a passagem de água e pequenas moléculas, resultando em lise osmótica¹. De acordo com Navarro et al.², o efeito da ECP começa com a sua ligação e agregação na superfície da célula, o que altera a permeabilidade da membrana e modifica o equilíbrio iônico intracelular. Esses sinais induzem alterações morfológicas e bioquímicas específicas, como a condensação da cromatina, a reversão da assimetria da membrana, produção de espécies reativas de oxigênio, ativação da atividade de caspase-3-like e, eventualmente, a morte celular.

Mesmo com a presença marcante dos EOS no estroma de alguns tipos de neoplasias malignas sólidas, particularmente as de origem epitelial, como os carcinomas espinocelulares (CECs) bucais, a função exata dessas células nesses tumores continua obscura⁵. A função protetora dos EOS contra a progressão tumoral se correlaciona principalmente com a síntese e secreção das proteínas citotóxicas estocadas em seus grânulos específicos, destacando-se a ECP³. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da ECP sobre a viabilidade de linhagens celulares derivadas de CECs bucais humanos.

¹ Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Centro-Oeste Dona Lindu – CEP 35501-296 – Divinópolis – MG

² Universidade de São Paulo – Departamento de Estomatologia, Patologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP – CEP 17012-901 – Bauru – SP
priscilalimaoliveira@yahoo.com.br

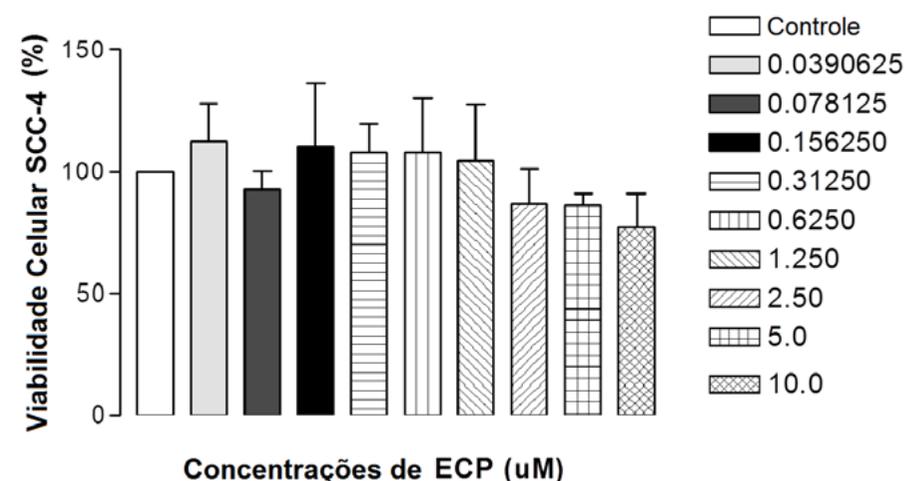
MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens SCC-4 e SCC-25 foram mantidas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, hidrocortisona 400ng/ml e 100ug/ml de gentamicina e kanamicina, a 37°C, numa atmosfera umidificada de CO₂ a 5%, como descrito por Agostini *et al.*⁶. O efeito da ECP sobre a viabilidade da SCC-4 e -25 foi avaliada por ensaio colorimétrico utilizando o 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MTT). Células SCC-4 e -25 (2x10⁵ células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços durante 24 horas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal de bovino. Poços do controle negativo receberam 100uL de meio DMEM/F12 completo, enquanto que as células tratadas foram incubadas durante 72 horas com 0,0390625uM; 0,078125uM; 0,15625uM; 0,3125uM; 0,625uM; 1,25uM; 2,5uM; 5uM e 10uM de ECP diluída em meio DMEM/F12 completo (100µL/poço). As absorbâncias resultantes foram lidas a 570nm num leitor de microplacas. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Foram feitas análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Nível de significância de 5% (p≤0,05) foi adotado para todos os testes estatísticos. Todas as comparações estatísticas foram feitas com o programa InStat v 3.00 (GraphPad Inc., EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

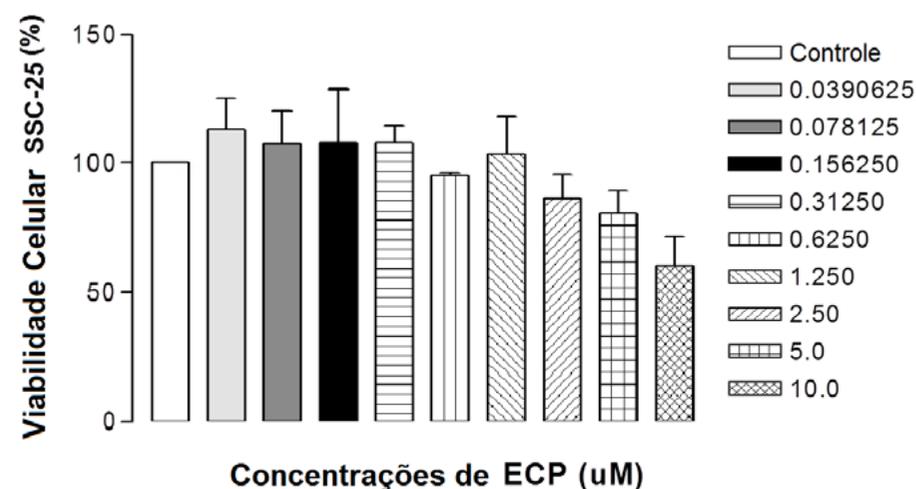
Os resultados mostraram que a ECP não exerceu efeito estatisticamente significativo sobre a viabilidade da linhagem SCC-4 em todas as concentrações testadas, como mostra a Figura 1.

Figura 1: Efeito citotóxico da ECP sobre viabilidade celular de SCC-4 medida pelo metabolismo de MTT. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos.



Diferentemente da SCC-4, a linhagem SCC-25 apresentou diminuição estatisticamente significativa (p≤0,05) de sua viabilidade, quando exposta à concentração de 10uM de ECP por 72 horas (Figura 2).

Figura 2: Efeito citotóxico da ECP sobre células SCC-25. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos. * p≤0,05 em comparação com células do controle.



Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem inferir que a ECP apresenta um efeito inibidor do crescimento, o qual é dependente do tipo celular. Resultados semelhantes foram descritos por Maeda *et al.*⁷, os quais relataram que a ação da ECP foi capaz de inibir o crescimento de quatro entre sete linhagens celulares humanas, dentre elas células derivadas de carcinoma epidermóide (A431) e de câncer de mama (MDA-MB-453), ambas de origem epitelial.

O mecanismo para a seletividade da ECP poderia ser explicado por diferenças na sensibilidade das células, dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram. Possivelmente células na fase G0 são insensíveis à ECP e apenas as células em fases de crescimento ativo seriam afetadas pela ação da proteína⁸. Adicionalmente, Agostini *et al.*⁶ relataram que a SCC-25 apresenta um potencial proliferativo significativamente maior do que a SCC-4, comprovado por curvas de proliferação e por reações imunocitoquímicas para os antígenos nucleares Ki-67 e PCNA. Esses dados em conjunto poderiam justificar o efeito inibidor da viabilidade de ECP observado na linhagem SCC-25.

CONCLUSÃO

O fato de ECP apresentar um efeito inibidor do crescimento dependente do tipo celular, bem como as linhagens celulares serem mais sensíveis à proteína, dependendo da fase do ciclo celular, podem fornecer uma explicação para a diferença no efeito citotóxico de ECP entre as linhagens utilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) CARRERAS, E. et al. Surface-exposed amino acids of eosinophil cationic protein play a critical role in the inhibition of mammalian cell proliferation. **Mol Cell Biochem**, v. 272, n. 1-2, p. 1-7, 2005.
- (2) NAVARRO, S. et al. The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 2, p. 324-37, 2008.
- (3) VENGE, P. et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties

- and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. **Clin Exp Allergy**, v. 29, n. 9, p. 1172-86, 1999.
- (4) JONSSON, U. B. et al. Polymorphism of the eosinophil cationic protein-gene is related to the expression of allergic symptoms. **Clin Exp Allergy**, v. 32, n. 7, p. 1092-5, 2002.
- (5) MUNITZ, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. **Allergy**, v. 59, n. 3, p. 268-75, 2004.
- (6) AGOSTINI, M. et al. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. **Oral Oncol**, v. 40, n. 7, p. 728-35, 2004.
- (7) MAEDA, T. et al. Growth inhibition of mammalian cells by eosinophil cationic protein. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 1, p. 307-16, 2002.
- (8) GLIMELIUS, I. et al. Effect of eosinophil cationic protein (ECP) on Hodgkin lymphoma cell lines. **Exp Hematol**, v. 39, n. 8, p. 850-8, 2011.