

# CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DA LINHAGEM CELULAR MCF-7 AO SER TRATADA COM O EXTRATO METANÓLICO DA *JODINA RHOMBIFOLIA*

**Juliana Saraçol Sassi<sup>1</sup>; Juliana Hartleben da Costa<sup>2</sup>; Viviane Maciel Silva<sup>3</sup>; Francisco Augusto Burkert Del Pino<sup>4</sup>**

## **Introdução**

O câncer é um dos principais causadores de morte no mundo sendo caracterizado pelo crescimento não programado e desordenado de células. A apoptose, morte programada da célula, é um fenômeno rápido no qual diversos genes estão envolvidos.

O gene BCL2 é o promotor da sobrevivência celular, atua na inibição da apoptose. O gene P53 atua como supressor de tumor e é mutado em todos os tipos de câncer humano (Machniewicz & Faucz, 2003).

Para determinar se a célula se prolifera ou se diferencia é essencial à proteína P21, reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular que será codificada no cromossomo 6 (Schneider, 2007).

O objetivo deste trabalho é avaliar se a apoptose é o mecanismo da ativação da morte celular quando a linhagem de MCF-7 é tratada com extratos metanólicos da *Jodina rhombifolia*.

## **Materiais e Métodos**

As células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e fibroblastos saudáveis (NH/3T3) foram semeadas,  $1 \times 10^6$  unidades, com 5 mL de meio de cultivo (DMEM+SBF/9:1) em placas de Petri (60mm) e deixadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% por 24 horas à 37 °C.

Com a aderência e proliferação foram adicionados 100µL dos extratos e após 48 horas na estufa de CO<sub>2</sub> a 5% as placas ficaram por 5 minutos no gelo, o meio de cultivo aspirado, as células lavadas com 1 mL de PBS (duas vezes), inserido 1 mL de Trizol<sup>®</sup> e após 2 minutos foram transferidas para tubos com 0,2 mL de clorofórmio PA, agitados por 15 segundos e deixados por 3 minutos a temperatura ambiente.

Ao serem centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos à 4°C foi formado um sistema trifásico com o RNA (fase intermediária), transferido para novos tubos, precipitados com 0,5 ml de álcool isopropílico e deixados por 24 horas a -20°C.

Foram descongelados e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos à 4°C e observado a formação de um *pellet* incolor que foi lavado com álcool etílico 75% e centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos à 4°C. O *pellet* foi dissolvido com 1 mL de água e deixado por 10 minutos a 60°C. O RNA foi quantificado com diluição em água miliQ (1:500) e feitas duas leituras em espectrofotômetro para ácidos nucleicos.

---

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biologia – UFPEL. E-mail: ju\_saracol@yahoo.com.br.

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Biologia – UFPEL.

<sup>3</sup> Mestranda em Química – UFPEL.

<sup>4</sup> Professor do Departamento de Bioquímica – UFPEL.

O kit SuperScript® foi usado para a síntese de cDNA PE - misturado 1µl do RNA total das amostras, a mesma quantidade de RNA controle, adicionado 1µl de dNTP 10mM, 1µl dos primers e 10 µl de água deionizada tratada com DEPC e deixados por 5 minutos a 65 °C.

Aos tubos foram adicionados 9 µl do RNA/primers (2µL de buffer RT 10x, 4µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mm, 2µL de DTT 0,1M e 1µL de RNase out), centrifugados e deixados por 2 minutos a 42 °C. Foi adicionado 1 µl de SuperScript II RT, menos nos controles, 1 µl de água tratada com DEPC e incubado por 50 minutos a 42 °C. Após 15 minutos a 70 °C foi transferido para o gelo, centrifugado, adicionado 1 µl de RNase H, incubado por 20 minutos a 37 ° e deixado a – 20 °C.

## Resultados e Discussões

No primeiro ensaio biológico (figura 1) foram utilizados os cDNAs em branco das linhagens celulares com resultado positivo. O gene P21 e BCL2 foram expressos de forma fraca.

A expressão do gene beta-actina teve resultado positivo em 3 amostras pela presença do marcador na região de 100 pb.

O melhor marcador foi o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) devido à característica de ser uma enzima envolvida na glicólise e conservada nas espécies.

No segundo ensaio (figura 2) foram testados no gel de agarose 0,8% os cultivos de MCF-7 tratados com extratos metanólicos da *Jodina rhombifolia* e suas diluições – extrato 2 - diluição 10, extrato 14 - diluição 10 e 60 e os controles celulares estavam íntegros.

Nos cDNAs dos cultivos 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. O gene BCL2 teve presença mais significativa nos cultivos tratados com os extratos MF210, MF1410 e MC e apareceu também em MF210, MF1460 e MC, com exceção do F1410 que estaria desencadeando um processo apoptótico.

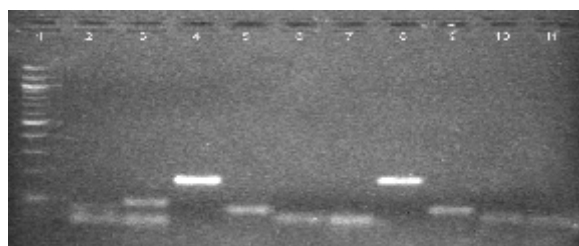


Figura 1: PCR em gel de agarose dos cultivos controle de MCF-7, 3T3 e controle do kit.

- |                       |                          |
|-----------------------|--------------------------|
| 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           |                          |

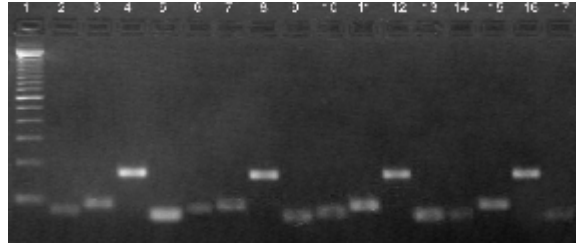


Figura 2: PCR em gel de agarose dos cultivos de MCF-7

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

## Referências Bibliográficas

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.