



EFEITO DA LEPTINA EM CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE CÉLULAS DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

Denilson Barbosa De Jesus, Eliane Macedo Sobrinho Santos, Alfredo Maurício Batista de Paula, Lucyana Conceição Farias

Introdução

A carcinogênese de boca é um processo complexo, onde se evidencia a ocorrência de inúmeras alterações genéticas e epigenéticas, que possibilitam a transformação de células biologicamente normais em células genética e funcionalmente alteradas, no que se refere a desregulações da proliferação celular e invasividade nos tecidos adjacentes e/ou à distância [1].

O processo de progressão tumoral do Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB) pode ser representado por uma sucessão de modificações no material genético e epigenético, que acarreta alterações teciduais particulares, como: displasia epitelial, carcinoma in situ, carcinoma invasivo e metástase. No evento de displasia, as células de um determinado estrato celular tendem a apresentar alterações morfológicas e estruturais, como pleomorfismo celular, hiperchromatismo nuclear e mitoses aberrantes, características estas também evidenciadas no carcinoma in situ. No entanto, nesse último estágio, todos os estratos celulares apresentam tais alterações morfológicas e as células encontram-se em um estágio altamente proliferativo e desorganizado, arquiteturalmente e citologicamente; contudo, continuam restritas ao epitélio. Já no carcinoma epidermóide invasivo, as células neoplásicas já apresentam um rompimento da membrana basal, iniciando o processo de invasão tecidual. Finalmente, o processo de metástase ocorre quando as células neoplásicas atingem órgãos à distância, por meio da disseminação vascular ou linfática [2].

A leptina tem sido apontada como fator de crescimento relacionado ao desenvolvimento de neoplasias; níveis elevados de leptina são considerados um fator de risco para o câncer de cólon, de mama e de próstata. A leptina age como um mediador mitogênico, anti-apoptótico, angiogênico e promotor do desenvolvimento tumoral [3]. Dados da literatura mostram o papel da leptina na proliferação celular. A investigação da via de sinalização da leptina, (nomeadamente a JAK/STAT e a ERK/AKT) revelou que esse hormônio desempenha um papel importante na ativação da STAT3, do ERK e AKT, sendo estas vias essenciais para a proliferação celular [4].

No que diz respeito ao CEB, a relação entre expressão da leptina e este tipo de neoplasia é uma questão controversa. Por isso, este estudo foi conduzido com o objetivo de investigar o efeito da leptina nas características de proliferação e migração das células do CEB.

Material e métodos

Foram utilizadas duas linhagens celulares imortalizadas de carcinoma de células escamosas de língua (SCC-9 e SCC-4), adquiridas comercialmente (ATCC, USA). Estas foram estocadas em ultra freezer a -80°C e criopreservadas em solução específica, até o momento do experimento. Estas foram estocadas em ultra freezer a -80°C e criopreservadas em solução específica, até o momento do experimento. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 contendo 10% de soro fetal bovino, 400ng/ml de hidrocortisona e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco, USA), conforme recomendação do fornecedor. Em seguida, foram tratadas com leptina recombinante humana (Gibco, USA) na concentração de 100ng/ml e ácido gálico (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, por um período de 72 horas. As células foram mantidas em estufa de CO_2 a 37°C .

A. Ensaio de proliferação celular

Para avaliar o comportamento proliferativo das células, foi utilizado o método de quantificação celular em câmara de Neubauer. O número de células por ml de uma suspensão quando contado foi obtido pela equação:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células}}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$



B. Ensaio de migração celular

A migração celular foi avaliada pelo ensaio de *wound-healing*. Brevemente, as células foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços até atingirem confluência aproximada de 60%. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e produzida uma escarificação na monocamada celular utilizando uma ponteira de 200 μ l. As células foram lavadas com tampão PBS e incubadas a 37° C na estufa com meios de cultura completo contendo 10% de soro fetal bovino, na presença ou na ausência das concentrações supracitadas de leptina e de ácido gálico. Nos tempos 0 e 72 horas, as imagens, por contraste de fase, de locais específicos do dano produzido foram capturadas. As imagens foram, então, analisadas e uma medida da área do dano (em μ m) foi realizada através do software específico avaliando quanto as células conseguiram avançar em busca da confluência. A quantificação da migração foi realizada pela porcentagem da área recoberta no tempo de cultivo determinado em relação ao tempo zero hora. Os dados foram expressos pela diferença entre a superfície recoberta em resposta à leptina e / ou ácido gálico e a condição basal na ausência de leptina e / ou leptina (% superfície recoberta leptina e / ou ácido gálico - superfície recoberta basal).

Resultados

A. Comportamento proliferativo das linhagens celulares SCC-9 e SCC-4 submetidas ao tratamento com leptina

A figura 1 mostra as alterações na proliferação de células após o tratamento das linhagens SCC-9 e SCC-4 durante 72 horas com concentrações de 100 ng / ml de leptina. Com base nos dados obtidos verificou-se que os resultados coincidiram para as linhagens celulares SCC-9 e SCC-4, sob as concentrações de 100 e 1000 ng/ml, nos tempos de 72 e 96 horas. Utilizando-se dessas concentrações nesses tempos foi observado um aumento no número de células quando comparadas com o grupo controle. Optou-se por prosseguir com o ensaio de migração celular utilizando a dose de 100ng/ml no tempo de 72 horas.

A. Comportamento migração das linhagens celulares SCC-9 e SCC-4 submetidas ao tratamento com leptina

A figura 2 mostra as medidas da área de escarificação no cultivo celular invadido por células SCC-9 e SCC-4 tratadas com leptina e não tratadas com leptina (grupo controle) no "wound healing assay". Ainda pode-se observar as fotografias representativas da migração celular no processo de "wound healing" para as diferentes condições experimentais obtidas na linha de base Tempo 0 e após 72 horas.

Os resultados demonstraram que as células tratadas com leptina possuem uma maior capacidade de migração quando comparadas com as células do grupo controle. Nas fotografias, pode-se que as células tratadas com leptina atingem a confluência depois de 72 horas, enquanto que as células do grupo controle, não.

Discussão

A leptina tem sido estudada por ser conhecida as suas propriedades proliferativas principalmente em células neoplásicas. A leptina foi amplamente identificada por induzir a proliferação e a ativação de células em diversos tipos de neoplasias. No presente estudo esta função da leptina também foi evidenciada nas células do CEB. Embora leptina seja um fator de crescimento em vários tipos de células, o mecanismo exato da proliferação de células induzido pela leptina não é totalmente compreendido.

A leptina é um hormônio secretado pelos adipócitos e produto do gene *ob*. Possui influência na redução da ingestão alimentar e no aumento do gasto energético pela sua ação no hipotálamo [5]. Além dos adipócitos, a leptina é produzida também na placenta, estômago e glândula mamária, bem como no coração e cartilagem óssea. Apesar da produção em vários tecidos os valores de leptina circulante estão mais estreitamente relacionados com a gordura corporal. Inúmeros fatores influenciam a produção de leptina incluindo a dieta, níveis de insulina, glicocorticóides e testosterona. A administração sistêmica e tópica de leptina acelera a reepitelização [6] sem influenciar a angiogênese [7]. A comprovação de que estes efeitos são mediados via receptor de leptina veio da ineficiência na reepitelização de feridas de camundongos diabéticos *db/db* geneticamente deficientes do seu receptor [7,8].

No presente estudo também pode ser observado que a leptina exerce efeito sobre a migração das células do CEB, uma vez que as células tratadas com leptina tiveram maior potencial migratório que as células não tratadas com leptina. A literatura mostrou que a leptina promoveu a migração de células epiteliais das mucosa oral humana [9]. Em diferentes linhagens celulares do câncer do cólon, tem sido mostrado que a leptina promove a migração e invasão através de múltiplas vias [10].



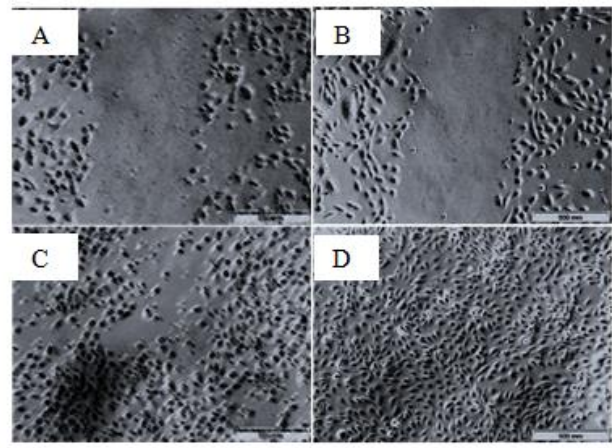
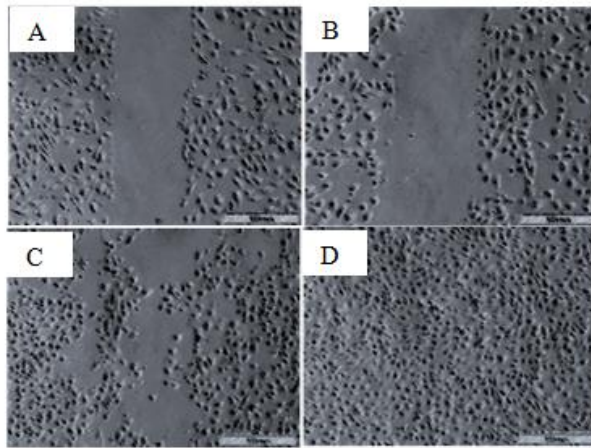
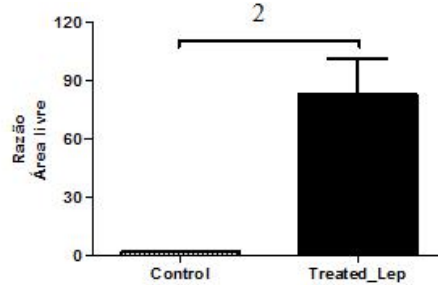
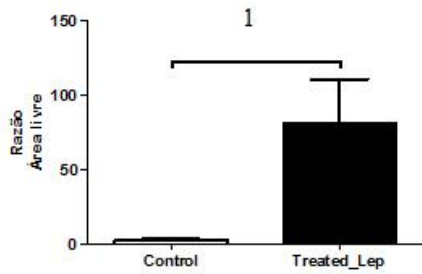
Considerações finais

A observação de que a leptina apresenta algum tipo de efeito sobre os tumores dos mais diversos tipos e sítios de localização parece apoiar hipótese de que a leptina pode estar envolvida, de forma ainda não muito esclarecida, no processo de desenvolvimento de neoplasias da cavidade oral. A investigação científica e a identificação da real influência da leptina e sua via de sinalização no estabelecimento e progressão do CEB, especialmente nas características de proliferação e migração das células, podem contribuir para a identificação de novos marcadores moleculares.

Dados da literatura mostram que o processo envolvido na associação da leptina e neoplasias é complexo e necessita de mais estudos, tendo em vista, especialmente, a escassez de estudos relacionados à via de sinalização da leptina e a tumorigênese de neoplasias de boca.

Referências

- [1] RODENHISER D, MANN M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2006 Jan 31;174(3):341-8.
- [2] MORAL M, PARAMIO JM. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histology and histopathology*. 2008 Oct;23(10):1269-78.
- [3] AMBROSINI G, NATH AK, SIERRA-HONIGMANN MR, FLORES-RIVEROS J. Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Sep 13;277(37):34601-9.
- [4] SHARMA D, SAXENA NK, VERTINO PM, ANANIA FA. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Jun;13(2):629-40.
- [5] CEDDIA, R.B.; WILLIAM, W.N. JR.; LIMA, F.B.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Pivotal role of leptin in insulin effects. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v 31, p. 715-722, 1998.
- [6] FRANK, S.; STALLMEYER, B.; KAMPFER, H.; KOLB, N.; PFEILSCHIFTER, J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. : *J. Clin. Invest.* v. 106, p. 501-509, 2000.
- [7] RING, B.D.; SCULLY, S.; DAVIS, C.R.; BAKER, M.B.; CULLEN, M.J.; PELLEYMOUNTER, M.A.; DANILENKO, D.M. Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. *Endocrinology*, v. 141, p. 446-449, 2000.
- [8] BLESSING, M.; SCHIRMACHER, P.; KAISER, S. Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions. *J. Cell. Biol.*, v. 135, p. 227-239, 1996.
- [9] UMEKI H, TOKUYAMA R, IDE S, OKUBO M, TADOKORO S, TEZUKA M, TATEHARA S, SATOMURA K. Leptin promotes wound healing in the oral mucosa. *PLoS One*. 2014 Jul 17;9(7):e101984. doi: 10.1371/journal.pone.0101984. eCollection 2014.
- [10] JAFFE T, SCHWARTZ B. Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Int J Cancer*. 2008 Dec 1;123(11):2543-56. doi: 10.1002/ijc.23821.



SCC-9

SCC-4

Figura 2. Área de de escarificação do cultivo com invasão por células SCC-9 (1) e SCC-4 (2) tratadas com leptina e não tratadas com leptina (grupo controle) no "wound healing assay" utilizados para medir a capacidade de migração de células (A). Fotografias representativas da migração celular no processo de "wound healing" para as diferentes condições experimentais obtidas na linha de base (A – D) e após 72 horas (E – H). A e E – Controle; B e F – Tratada com leptina; C e G – Tratada com ácido gálico; D e H – Tratada com leptina e ácido gálico. Barras horizontais indicam $p < 0,05$ entre os grupos; teste T de student.

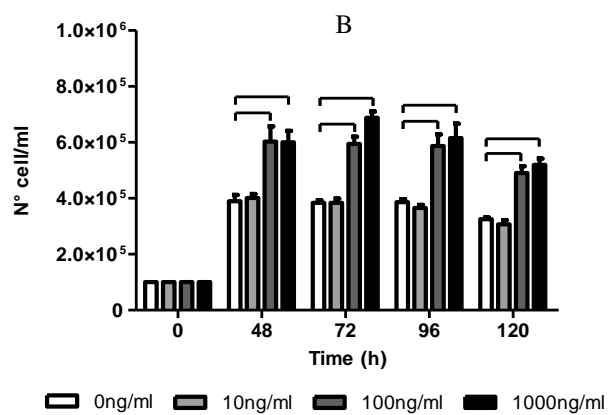
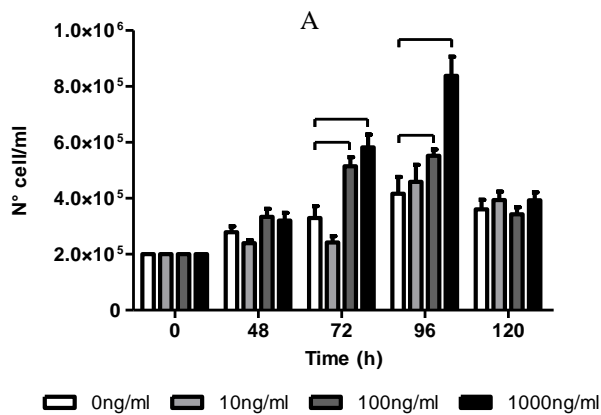


Figura 1. Alterações na proliferação de células após o tratamento das linhagens SCC-9 (A) e SCC-4 (B) durante 72 horas com concentrações de 100 ng / ml de leptina. Barras horizontais indicam $p < 0,05$ entre os grupos; teste Anova.