



EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA LEPTINA NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

Victória Thaís Ferreira Leão, Eliane Macedo Sobinho Santos, Talita Antunes Guimarães, Carlos Alberto De Carvalho Fraga, Alfredo Maurício Batista de Paula, André Luiz Sena Guimarães, Lucyana Conceição Farias

Introdução

O carcinoma epidermóide de boca (CEB), também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, é um grave problema de saúde pública em diversos países do mundo, sendo responsável por mais de 90% de todas as neoplasias orais malignas. Acomete, com maior frequência, indivíduos do gênero masculino, com idade superior a 60 anos, associado a hábitos tabagista e/ou etilista [1].

A etiopatogênese do CEB é atribuída a fatores genéticos, epigenéticos e a influências ambientais, particularmente relacionadas ao estilo de vida do indivíduo, como o tabagismo crônico e etilismo. A progressão do CEB sofre influência importante da angiogênese tumoral. A neovascularização mostrou-se aumentada na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide em relação à mucosa bucal clínica e histologicamente normal. Além disso, a formação vascular foi significativamente aumentada na mucosa normal adjacente a tumores, quando comparada à mucosa normal sem lesão concomitante [2]. Embora alguns estudos salientem a existência de uma forte associação entre o grau de vascularização com o estágio avançado da doença, metástase e invasão em neoplasias de mucosa jugal e língua, outros relatam que a determinação do índice angiogênico não se configura como um bom indicador de prognóstico em carcinomas de cavidade oral [3]. Apesar dos resultados controversos sobre a função da angiogênese no desenvolvimento e progressão do CEB, este mecanismo apresenta-se como um importante elemento de estudo para melhor compreensão da patogênese do CEB, podendo vir a ser utilizado como alvo terapêutico.

Um fator importante liberado a partir de tecido adiposo, que pode impactar na angiogênese tumoral é a leptina, um adipocitocina, que promove a proliferação e diferenciação angiogênica de células endoteliais *in vitro* e *in vivo* [4]. Distribuição específica de leptina e de seu receptor *OB-R*, sugere uma ação autócrina e parácrina importante para a leptina no tecido adiposo humano. A expressão do gene *Ob-R* no tecido adiposo branco humano não está restrito a adipócitos; este pode ser identificado em células endoteliais e células do sistema imunológico residente no interior do tecido adiposo [5]. Como outras citocinas, a leptina é uma molécula ubíqua e pleiotrópica, que está envolvida em um número cada vez maior de mecanismos, isto é, o equilíbrio de energia, a inflamação, reprodução, carcinogênese e angiogênese. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a expressão diferencial de genes envolvidos na via de sinalização da leptina no CEB.

Material e métodos

A. Casuística

Esse estudo envolveu a utilização de 42 amostras de tecidos de CEB e 42 fragmentos de mucosa bucal inalterada clínica e histologicamente. Os materiais biológicos e dados clínicos foram provenientes do Banco de Materiais Biológicos Humano do Norte do Estado de Minas Gerais (Biobanco Institucional - UNIMONTES/ Registro CONEP: B-013), que já conta com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado pelos indivíduos envolvidos no estudo.

B. Avaliação da expressão do mRNA dos genes *Lep*, *LepR*, *HIF-1 α* e do microRNA "mir-210"

Os níveis de mRNA do genes *Lep*, *LepR*, *HIF-1 α* , *VEGF*, *VEGFR1*, *VEGFR2* e *mir-210* foram avaliados nos grupos estudados (amostras criopreservadas), através da técnica PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Para isso, o RNA total foi extraído e utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando a enzima transcriptase reversa. Para as reações de amplificação em tempo real foi utilizado o reagente SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), contendo a molécula fluorescente e os demais reagentes necessários à amplificação. Os primers que foram utilizados para essa técnica correspondem aos primers específicos para o cDNA dos genes de interesse. A confecção e verificação dos parâmetros dos primers foram realizados através do software *primer express*. A



o FEPEG FÓRUM DE ENSINO,
PESQUISA, EXTENSÃO
E GESTÃO

TRABALHOS CIENTÍFICOS APRESENTAÇÕES ARTÍSTICAS E CULTURAIS DEBATES MINICURSOS E PALESTRAS

23 A 26 SETEMBRO DE 2015
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

ISSN 1806-549X

A HUMANIZAÇÃO NA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



análise dos pares de bases foram executadas através do programa BLASTN, sintetizados pela empresa Invitrogen. As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados.



FEPEG

FÓRUM DE ENSINO,
PESQUISA, EXTENSÃO
E GESTÃO

TRABALHOS CIENTÍFICOS APRESENTAÇÕES ARTÍSTICAS E CULTURAIS DEBATES MINICURSOS E PALESTRAS

23 A 26 SETEMBRO DE 2015
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

ISSN 1806-549X

A HUMANIZAÇÃO NA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

REALIZAÇÃO



APOIO



Resultados

O nível de expressão de RNAm de *LepR* (A), *mir210* (B) e *HIF-1a* (C) em tecidos clínicos e histologicamente inalterados da mucosa oral e em tecidos de carcinoma epidermóide de boca estão apresentados na figura 1. Os resultados mostraram uma expressão significativamente aumentada de *HIF-1a*, e reduzida de *LepR*. O *mir-210* teve sua expressão aumentada no CEB, mas sem significância estatística.

Não foi observada expressão de *Lep* (leptina ligante) nas amostras teciduais de mucosa oral normal e CEB. A hipótese levantada é que a leptina exerce os seus efeitos biológicos sobre as células pelo modo endócrino clássico, não sendo expressa de maneira relevante em neoplasias sólidas. Embora dados da literatura tenham mostrado a importância dos efeitos endócrinos, parácrinos e autócrinos da leptina e a importância do receptor da leptina na carcinogênese mamária.

Discussão

Curiosamente os resultados do presente estudo mostraram diferença significativa na expressão de *LepR* na mucosa normal e CEB, sendo uma maior expressão encontrada na mucosa normal. Na literatura foi encontrado um estudo demonstrando um aumento da expressão do *LepR* na mucosa oral em humanos [5]. O que está condizente com o fato de que as células epiteliais e as células endoteliais vasculares na mucosa oral são alvo para a atuação da leptina.

Genes relacionados ao mecanismo da angiogênese (neoformação vascular) podem contribuir sobremaneira para o desenvolvimento e progressão tumoral do CEB. Em processos patológicos, como a carcinogênese, um fenótipo angiogênico pode ocorrer devido à superexpressão de fatores angiogênicos e à baixa expressão de inibidores do processo. Foi relatado que a aquisição de tal fenótipo pode ocorrer antes do tumor adquirir propriedades invasivas, sendo, portanto, essencial para a nutrição das células neoplásicas, crescimento local do tumor, bem como para o desenvolvimento de metástase [6]. O principal fator envolvido no processo angiogênico é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que são proteínas altamente potentes e específicas que atuam no aumento da permeabilidade dos vasos, crescimento, proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais, por meio da ligação às quinases receptoras de tirosinas específicas [7].

Evidências experimentais têm demonstrado a correlação entre VEGF e *HIF1 α* no CEB. A literatura reporta que a deleção do gene *HIF1 α* ou falha na transcrição do *HIF1 α* implicando na redução de secreção de VEGF pelas células tumorais, suprimem a angiogênese e retarda o crescimento de tumores sólidos. Neste contexto pôde-se verificar um aumento na produção de VEGF secretado por linhagens celulares de câncer de boca, em resposta a uma queda do nível de oxigênio. Da mesma forma, foi demonstrado que os níveis basais de expressão de VEGF e *HIF1 α* apresentaram-se elevados em linhagens celulares desta neoplasias, em comparação com os queratinócitos normais [8]. Esses dados são corroborados pelos resultados obtidos no presente estudo, em que a expressão do *HIF-1a* foi significativamente maior no CEB, quando comparado com a mucosa normal.

Uma outra vertente que aborda moléculas envolvidas na angiogênese no CEB refere-se à ação de microRNAs (miRNAs) [9]. Estes são pequenas moléculas de RNA não codificadoras, que desempenham papel significativo como moléculas reguladoras da expressão gênica e têm sido associadas com diversos processos celulares relacionados à carcinogênese e progressão tumoral. Os miRNAs estão envolvidos em muitos processos patológicos incluindo a apoptose e sobrevivência celular, a proliferação celular, diferenciação e migração [10]. O estudo da função de miRNA na indução da angiogênese é importante como um potencial alvo terapêutico. Evidências apontam que a família do miR-210 participa do controle de genes envolvidos na angiogênese, porém seu papel específico no CEB ainda não está bem definido. No nosso estudo não foi observada diferença de expressão do *mir210* na mucosa normal e CEB. Este fato pode ser explicado pela presença da angiogênese no tecido conjuntivo, como forma de promover a cicatrização de feridas na mucosa oral.

Considerações finais

Dada a escassez de dados na literatura sobre o papel da sinalização da leptina no CEB, e as controvérsias do papel deste hormônio na proliferação celular, angiogênese e no desenvolvimento tumoral, este estudo buscou melhor elucidar a ação da leptina em neoplasias específicas da boca, especialmente em relação ao comportamento biológico de tais enfermidades. Dessa forma, esse estudo foi desenvolvido com o intuito de melhor compreender a sinalização da leptina no CEB, com um enfoque em seus mecanismos de regulação e expressão gênica, associação com a angiogênese tumoral e sua possível influência sobre o comportamento clínico-patológico de tais neoplasias.



A avaliação dos efeitos da via de sinalização da leptina sobre o desenvolvimento do CEB, sugere que a leptina pode potencializar a invasão e adesão celular, demonstrando a influência deste hormônio no crescimento e sobrevivência de células neste tipo de câncer, por meio do favorecimento da angiogênese.

Estudos adicionais são necessários na busca de evidências que apontam a leptina como um dos fatores cruciais no processo angiogênico, impulsionando o crescimento do CEB. É constatado tais evidências, esforços deverão ser focados na identificação da sinalização da leptina e sua regulação como um potencial marcador de comportamento clínico, ou como possíveis alvos para terapias no CEB.

Referências

- [1] DEDIVITIS RA FC, MAFRA ACB, GUIMARÃES FT, GUIMARÃES AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70:69.
- [2] CARLILE J HK, BAILLIE R, OGDEN GR, SCHOR SL. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: Possible relevance to angiogenesis, tumor progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med.* 2001;30:9.
- [3] ARTESE L, RUBINI C, FERRERO G, FIORONI M, SANTINELLI A, PIATTELLI A. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer research.* 2001 Jan-Feb;21(1B):689-95.
- [4] SIERRA-HONIGMANN MR, NATH AK, MURAKAMI C, GARCIA-CARDENA G, PAPAPETROPOULOS A, SESSA WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science.* 1998 Sep 11;281(5383):1683-6.
- [5] BORNSTEIN SR, ABU-ASAB M, GLASOW A, PATH G, HAUNER H, TSOKOS M, et al. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes.* 2000 Apr;49(4):532-8.
- [6] ONESTO C, HANNOUN-LEVI JM, CHAMOREY E, FORMENTO JL, RAMAIOLI A, PAGES G. Vascular endothelial growth factor-A and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance. *British journal of cancer.* 2006 May 22;94(10):1516-23.
- [7] THOMAS GR, NADIMINTI H, REGALADO J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of experimental pathology.* 2005 Dec;86(6):347-63.
- [8] MOHAMED KM, LE A, DUONG H, WU Y, ZHANG Q, MESSADI DV. Correlation between VEGF and HIF-1 α expression in human oral squamous cell carcinoma. *Experimental and molecular pathology.* 2004 Apr;76(2):143-52.
- [9] FIORE R, KHUDAYBERDIEV S, SABA R, SCHRATT G. MicroRNA function in the nervous system. *Progress in molecular biology and translational science.* 2011;102:47-100.

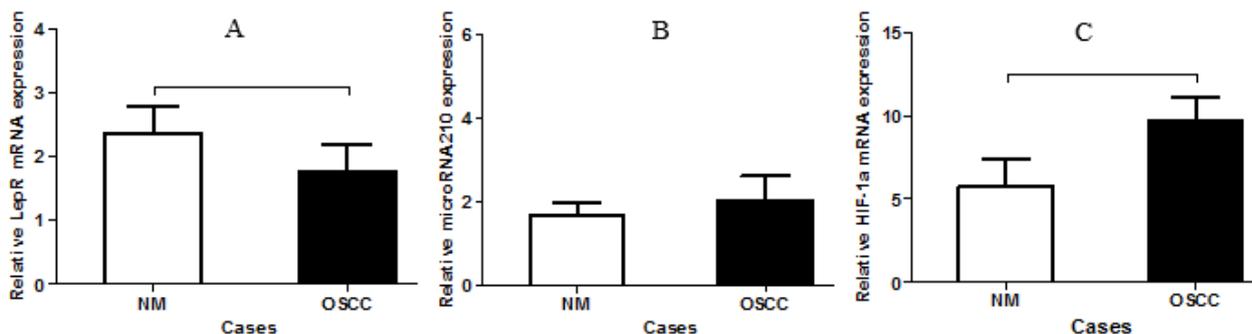


Figura 1. Nível de expressão de RNAm de LepR (A), mir210 (B) e HIF-1 α (C) em tecidos clinicamente saudáveis da mucosa oral (MN: Mucosa Normal) e em tecidos de carcinoma epidermóide de boca (do Inglês: OSCC). Em ambas as análises, a expressão do gene é mostrado como a média. Todas as reações foram normalizadas pela β -actina ou RNU44. Barras horizontais indicam $p < 0,05$ entre os grupos; teste T de student.