

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): HANNA THAYNARA ALVES TEIXERA MAGALHÃES, MARCELA GONÇALVES DE SOUZA, SABRINA FERREIRA DE JESUS, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, ELIANE MACEDO SOBRINHO SANTOS, LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS, ROGÉRIO GONÇALVES DA ROCHA

Leptina compromete o efeito terapêutico da radiação ionizante em células de carcinoma epidermóide de boca

Introdução

O carcinoma epidermóide de boca (CEB) é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento, sendo considerada a neoplasia maligna mais comum em mucosa bucal (DEDIVITIS *et al.*, 2004). A radioterapia (RT) é uma importante modalidade terapêutica para o CEB, especialmente quando o indivíduo acometido pela doença não apresenta condições clínicas para ser submetido à cirurgia ou não aceitar as possíveis mutilações faciais que a intervenção cirúrgica pode acarretar. Os pacientes com CEB avançado necessitam de RT adjuvante, sendo ela pré ou pós-operatória (VIKRAM, 1998).

A etiopatogênese do CEB é atribuída a fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, particularmente relacionadas ao estilo de vida, como o tabagismo e etilismo (SEETHALAKSHMI, 2013). Estudos têm relatado a presença de leptina (Lep) e seu receptor em cânceres gástrico, colo retal, da mama e outros (FRANKENBERRY *et al.*, 2006; CHIA *et al.*, 2007; CASCIO *et al.*, 2008). Alterações em proteínas componentes do sistema ubiquitina-proteassoma (UP), que promove degradação proteolítica, tem sido associado ao desenvolvimento de neoplasias. Dentre elas, as proteínas UBC e USP2 podem desregular genes supressores de tumor e oncogenes, além de afetar a sensibilidade de células neoplásicas à quimio e/ou radioterapia (BENASSI *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao CEB, a importância da Lep e o sistema UP nessa neoplasia não é bem esclarecida. A investigação científica da real influência dessas proteínas e sua via de sinalização no estabelecimento e progressão do CEB podem contribuir para a identificação de novos marcadores moleculares relacionados à sensibilidade e resistência das células neoplásicas à ação da radioterapia. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da Lep sobre a proliferação celular do CEB, associada a mecanismos moleculares de ubiquitinação, sob radiação ionizante.

Material e métodos

A. Cultivo celular, tratamento com Lep e radiação ionizante

As linhagem celulares imortalizada de CEB, SCC-9 (ATCC, USA), 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). As células foram tratadas com 100ng/ml de Lep (Invitrogen, USA), por 72 horas. Os tratamentos com radiação ionizante foram realizados no dia da administração da última dose de Lep, através da exposição das células em semiconfluência. As células foram tratadas com dose de 6 Gy de cobalto-60 (gray: unidade internacional de dose de radiação ionizante), utilizando-se um acelerador linear Telecobalto Theratron Phoenix Philips SR 7510 (Eindhoven, Holanda), a uma distância fonte-campo de 70cm.

B. Determinação do efeito da radiação e/ou Lep sobre proliferação celular

Para avaliar o comportamento proliferativo das células submetidas aos tratamentos experimentais, foi utilizado o método de quantificação celular em câmara de Neubauer. O número de células por ml de uma suspensão foi obtido pela equação: N° de células/ml = (N° total de células / N° de quadrantes contados) x fator de diluição x 10.000. Os dados de proliferação foram obtidos 72 horas após a administração da radiação, totalizando assim, 144h após o início experimental (72h de tratamento com Lep, seguido de irradiação e 72h de pós-radioterapia para análise da proliferação).

Após acontagem das células irradiadas e células não irradiadas, o índice de sobrevivência (IS) foi calculado de acordo com a equação a seguir: $IS = (N^{\circ}$ total de células irradiadas / N° total de células não irradiadas) x 100.

E. Ensaio de expressão gênica

Através do método qRT-PCR, investigou-se a associação entre o fenótipo obtido no ensaio de proliferação e expressão dos genes UBA e USP2, relacionados à degradação e ubiquitinação de proteínas. Para isso, o RNA total foi isolado com Trizol (Invitrogen, USA). Realizou-se a transcrição reversa utilizando o Reverse Transcription Kit (Invitrogen, USA). Utilizou-se método Taqman num sistema de equipamento StepOne (Applied Biosystems, USA).

Resultados e discussão



A. A Lep atua favorecendo a proliferação celular e protegendo as células dos efeitos radioterápicos

A Fig. 1 apresenta o comportamento proliferativo das células SCC-9 tratadas e grupo controle, depois de serem submetidas à dose de 6GY de radiação ionizante. As células do grupo controle “não tratadas com Lep e irradiadas” sofreram diminuição nos níveis de proliferação. As células tratadas com Lep e irradiadas, apresentaram altos níveis proliferativos, sugerindo que a Lep pode ser um fator associado à radiorresistência das células neoplásicas, uma vez que estas mantiveram o fenótipo proliferativo, mesmo sob altas doses de radiação ionizante (Fig. 1A). A fotografia representativa apresentada na Fig. 1A ilustra a proliferação celular para as diferentes condições experimentais. Pode-se observar o número aumentado de células do grupo tratado com Lep, mesmo após à exposição da radiação.

Os dados de Índice de sobrevivência das células do “grupo controle não tratado com leptina” e do “grupo tratado com leptina” depois de terem sido irradiadas estão apresentados na Fig. 1B. Os resultados mostraram que a Lep, apesar da irradiação, pode favorecer a sobrevivência das células neoplásicas. As células neoplásicas SCC-9 não tratadas com Lep (controle) apresentaram uma diminuição de 19,1% no Índice de sobrevivência, quando comparadas ao grupo tratado com Lep.

B. Lep favorece proliferação celular aumentando a expressão de UBA e USP2, mas, sob radiação, a proliferação foi UBA- e USP2-independentes

Foi possível observar uma superexpressão de RNAm de UBA no grupo tratado com Lep, quando comparada ao grupo controle (sem tratamento) (Fig. 2A), sugerindo uma associação do aumento da proliferação celular provocada pela Lep e um aumento da expressão desse gene. Neste caso, o domínio UBA deve estar associado com uma proteína inibidora de proliferação, favorecendo sua degradação e, conseqüentemente, o prosseguimento das fases do ciclo celular. A UBA (ubiquitin-associating), componente do sistema ubiquitina-proteassoma (UP), interage com várias cadeias mono- ou poli-ubiquitina, promovendo a degradação proteossomal (BUCHBERGER, 2002). No entanto, a radiação não alterou a expressão deste transcrito e ainda impediu a ação da Lep sobre a expressão de UBA conforme observa-se na Fig. 2B.

A USP2, proteína desubiquitinase com ação oncogênica, apresentou-se aumentada no grupo tratado por Lep e diminuída nos grupos submetidos à radiação ionizante, por meio de análises de qPCR (Fig. 3). Os resultados são condizentes com a literatura, pois o comportamento oncogênico desta proteína é atribuído à sua interação e prevenção da degradação proteossômica de proteínas específicas envolvidas em diferentes vias celulares, como a sintetase de ácidos graxos (FASN), Mdm2, MdmX, AIF, Ciclina D, Aurora-A e EGFR (GRANER *et al.*, 2004). De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que o aumento da proliferação celular observado no grupo tratado com Lep e irradiado seja um fenômeno que ocorreu independente da atuação de UBA e USP2. No entanto, um dado relevante do estudo trata-se o efeito da Lep favorecendo o aumento na expressão da USP2, em oposição à ação da radiação sobre a expressão dessa enzima.

Considerações finais

Os resultados demonstram que a Lep, além de promover o fenótipo proliferativo de células do CEB por atuar em mecanismos moleculares de degradação proteolítica, pode, também, estar envolvida em mecanismos de resistência à radioterapia. Ainda que parciais, os achados deste estudo podem sugerir um papel protetor da Lep na resposta celular ao estresse oxidativo, induzido pela radiação ionizante, em especial sobre o carcinoma de boca. Talvez, estratégias terapêuticas, adjuvantes à radioterapia, que levem à redução dos níveis de Lep podem favorecer a radiosensibilização do CEB.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brasil. Os autores também agradecem à Universidade Estadual de Montes Claros.

Referências bibliográficas

- BUCHBERGER, A. From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol*, United States, v. 12, p. 216–221, 2002.
- BENASSI, B. *et al.* USP2a alters chemotherapeutic response by modulating redox. *Cell Death Dis*, United States, v.4, p.e812, 2013.
- CASCIO, S.B.V. *et al.* Mechanism of leptin expression in breast cancer cells: role of hypoxia- inducible factor-1alpha. *Oncogene*, United States, v.27, n.4, p.540-7, 2008.
- CHIA, V.M. *et al.* Leptin concentrations, leptin receptor polymorphisms, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.16, n.12, p.2697-703, 2007.



DEDIVITIS, R.A. *et al.* Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. Rev Bras Otorrinolaringol, São Paulo, v.70, n.1, p. p. 35-40, 2004.

FRANKENBERRY, K.A. *et al.* Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer. International journal of oncology; United States, v.28, n.4, p.985-93, 2006.

GRANER, E. *et al.* The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. Cancer Cell, United States, v. 5, n.3, p.253-61, .2004.

SEETHALAKSHMI, C. Early Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) - Role of Genetics: A Literature Review. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR, United States, v.7, n.8, p.1824-6, 2013.

VIKRAM, B. Adjuvant therapy in the head and neck cancer. CA Cancer J Clin, United States, v.48, n.4, p.199-209, 1998.

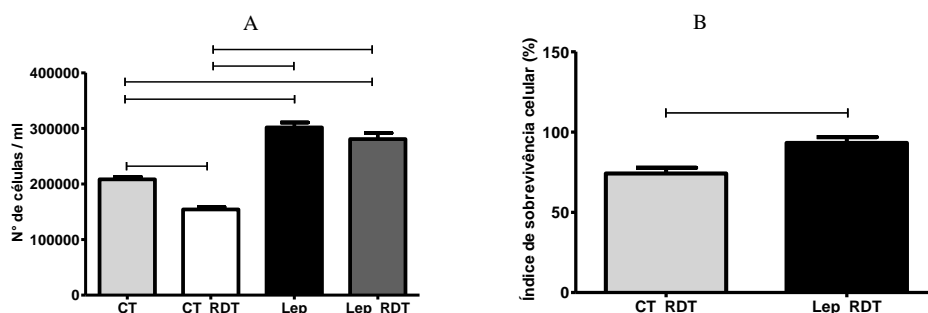


Figura 1. (A) Alterações na proliferação de células SCC-9 após o tratamento, durante 72 horas, com concentração de 100ng/ml de Lep e administração de dose de 6GY de radiação ionizante (RDT). (B) Índice de sobrevivência das células SCC-9 tratadas com 100ng/ml de Lep e grupo controle não traado; ambos os grupos sob irradiação com 6 Gy de cobalto. Barras horizontais indicam $p < 0,05$ entre os grupos; Teste Anova ou Tetste T. CT: grupo controle não irradiado; CT_RDT: grupo controle irradiado; Lep: grupo tratado com Lep e não irradiado; Lep_RDT: grupo tratado com Lep e irradiado

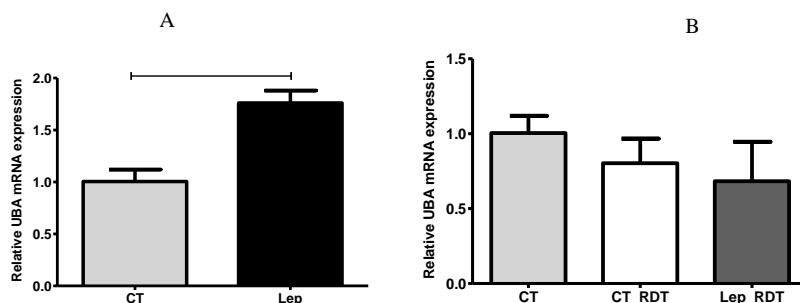


Figura 2. Resultados de qRT-PCR de RNAm da UBA em células SCC-9. Barras horizontais indicam $p < 0,05$ entre os grupos; Teste Anova ou Teste T. CT: grupo controle não irradiado; CT_RDT: grupo controle irradiado; Lep: grupo tratado com Lep e não irradiado; Lep_RDT: grupo tratado com Lep e irradiado. (A) Ensaio na ausência de radiação ionizante. (B) Ensaio na presença de irradiação com 6 Gy de cobalto.

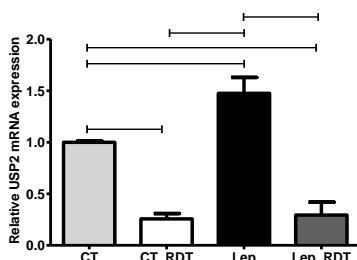


Figura 3. Resultados de qRT-PCR de RNAm da USP2 em células SCC-9 na presença de irradiação com 6 Gy de cobalto. Barras horizontais indicam $p < 0,05$ entre os grupos; Teste Anova ou Teste T. CT: grupo controle não irradiado; CT_RDT: grupo controle irradiado; Lep: grupo tratado com Lep e não irradiado; Lep_RDT: grupo tratado com Lep e irradiado.