



Expressão do gene Receptor da Leptina (LepR) em linhagem celular de carcinoma epidermóide de boca: uma nova abordagem para a carcinogênese bucal

Sueli Nunes Fonseca, Eliane Macedo Sobrinho Santos, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Talita Antunes Guimarães, Ludmila Regina de Souza, Andre 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].

Embora, acredita-se que exista uma relação entre os eventos relacionados ao desenvolvimento embrionário dos tecidos e o surgimento da neoplasia [2], ainda não há uma compreensão precisa do processo da carcinogênese bucal, principalmente pela sua etiologia multifatorial e complexa patogênese [3]. Dessa forma, crescentes esforços têm sido empregados para a melhor compreensão dos eventos moleculares, da susceptibilidade genética e dos fatores de risco que atuando em conjunto para a origem e progressão do CEB.

A leptina é uma proteína multifuncional de 16 kDa, que consiste de 167 aminoácidos, produzida predominantemente pelo tecido adiposo [4]. Os receptores transmembranares da leptina (LepR) são responsáveis pela atividade deste hormônio. O LepRb é um dos responsáveis pela ativação de vias de sinalização intracelulares. A ligação da leptina ao LepRb pode ativar vários genes envolvidos na proliferação celular e na regulação da expressão de fatores angiogênicos. Além disso, a via de sinalização da leptina pode exercer um papel relevante no desenvolvimento de neoplasias malignas [5].

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão do gene LepR em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca, buscando identificar novos alvos moleculares possivelmente envolvidos na carcinogênese de boca.

Material e métodos

Trata-se de um estudo piloto, experimental.

A. Cultura celular

Duas linhagens celulares humanas imortalizadas, em cultura, foram utilizadas nesse estudo: SCC-9 (linhagens de carcinoma de células escamosas de língua) e HACAT (Queratinócito humano imortalizado), sendo a última utilizada como grupo de referência para a análise de expressão do gene *LEPR* gênica. Estas foram estocadas em ultra freezer a -80°C e criopreservadas em solução específica. Tais linhagens foram adquiridas comercialmente (ATCC, USA), não necessitando, pois, de aprovação por comitê de ética para a realização do estudo.

As células foram descongeladas em banho maria a 37°C e cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 acrescido de 1% de antibiótico e 10% de soro fetal bovino (Lifetechnologies, USA). Os passos para o descongelamento e cultivo celular foram realizados de acordo com recomendação do fornecedor das linhagens.

B. Avaliação da expressão do mRNA do LepR

Os níveis de mRNA do LepR nas linhagens celulares foram avaliados através da técnica PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [6]. Para isso, o RNA total foi isolado das amostras, utilizando o reagente TRIZOL® (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA) de acordo com a especificação do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria e a pureza considerada foi de 1,8 a 2,0 (leitura 260/280). Em seguida, foi verificada sua integridade através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo a brometo de etídio. A identificação de duas bandas distintas representa o RNA ribossomal (28S e 18S), confirmando a integridade do RNA (Figura1). O RNA extraído foi 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 utilizados para essas técnicas correspondem



aos primers específicos para o cDNA dos genes de interesse. A confecção e verificação dos parâmetros dos primers foram realizadas através do software *Primer Express*. A análise dos pares de bases foram executadas através do software BLASTN, a fim de confirmar o anelamento e similaridade com outros genes. As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata, e os primers *forward* e *reverse* (Tabela 1) avaliados, previamente, quanto a eficiência de amplificação, afim de garantir a confiabilidade dos resultados.

Resultados

Análise quantitativa da expressão do gene LepR

Como ilustrado na figura 2, o gene *LepR* apresentou uma maior expressão na linhagem celular SCC9 quando comparada à linhagem Hacat.

Discussão

Neste estudo foi observada a expressão do gene *LepR* nas linhagens celulares SCC9 e Hacat. Estudos tem mostrado, através de técnicas imunohistoquímicas, estudos *in vitro* e de biologia molecular, a expressão de receptores hormonais em queratinócitos de mucosa bucal [7] sugerindo que o mecanismo de proliferação e invasão tecidual do CEB pode, também, apresentar uma via hormônio-dependente [7]. Destacou-se, nesse estudo piloto, uma possível influência da expressão do gene *LEPR* no CEB.

Estudos têm relatado a presença de leptina e seus receptores no câncer gástrico, colo retal e da mama [9]. Foi verificada a presença de receptores de leptina, isoformas curta e longa, em linhas celulares de carcinoma do cólon e em tecido humano de câncer de cólon [10]. No carcinoma celular renal, foi documentado que níveis plasmáticos de leptina elevados e expressão aumentada de *LEPR* estão positiva e significativamente relacionados com a presença de invasão neoplásica em indivíduos acometidos por este tipo de carcinoma [11]. No CEB, este estudo apresenta, pela primeira vez, dados moleculares sobre a expressão do *LEPR*, sugerindo um possível envolvimento desse gene na carcinogênese de boca.

No entanto, por se tratar de um estudo piloto, estudos em amostras teciduais e estudos funcionais, em modelos *in vivo* e *in vitro*, são necessários para melhor entender a importância da via de sinalização da leptina na patogênese do CEB.

Conclusão

A identificação de expressão aumentada de receptores de leptina na linhagem celular de carcinoma epidermóide de boca sugere que a via da leptina pode representar um potencial alvo molecular tanto para o entendimento do mecanismo da carcinogênese bucal, como para a identificação de possíveis alvos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a doença.

Referências

- [1] NEVILLE BWD, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Patologia oral e maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.
- [2] CUNHA, G.R., *et al.* Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. J Steroid Biochem Mol Biol. 2004 Nov;92(4):221-36. Epub 2004 Dec 21. Review.
- [3] TABOR, M.P.; *et al.* Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. Clin Cancer Res. 2001 Jun;7(6):1523-32.
- [4] BARATTA, M. Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. Med Sci Monit. 2002 Dec;8(12):RA282-92.
- [5] FRUHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. The Biochemical journal. 2006 Jan 1;393(Pt 1):7-20.
- [6] LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Methods 2001;25:402-8.
- [7] ISHIDA, H.; *et al.* Critical role of estrogen receptor on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 2007 May;98(5):636-43. Epub 2007 Mar 9.
- [8] FRANKENBERRY, K.A.; *et al.* Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer. International journal of oncology. 2006 Apr;28(4):985-93.
- [9] HARDWICK JC, G. R.; *et al.* Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. Gastroenterology 2001;121 (1):12.
- [10] Horiguchi, A.; *et al.* Increased serum leptin levels and over expression of leptin receptors are associated with the invasion and progression of renal cell carcinoma. J Urol. 2006 Oct;176(4 Pt 1):1631-5

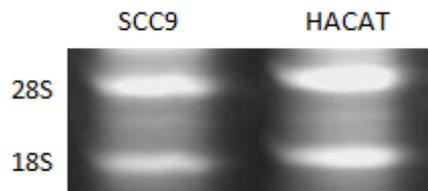


Figura 1. Gel de agarose 1% ilustrando a integridade dos RNA nas linhagens SCC9 (carcinoma epidermóide de boca) e HACAT (queratinócito humano normal). As bandas 18S e 28S correspondem às subunidades do RNA ribossomal.

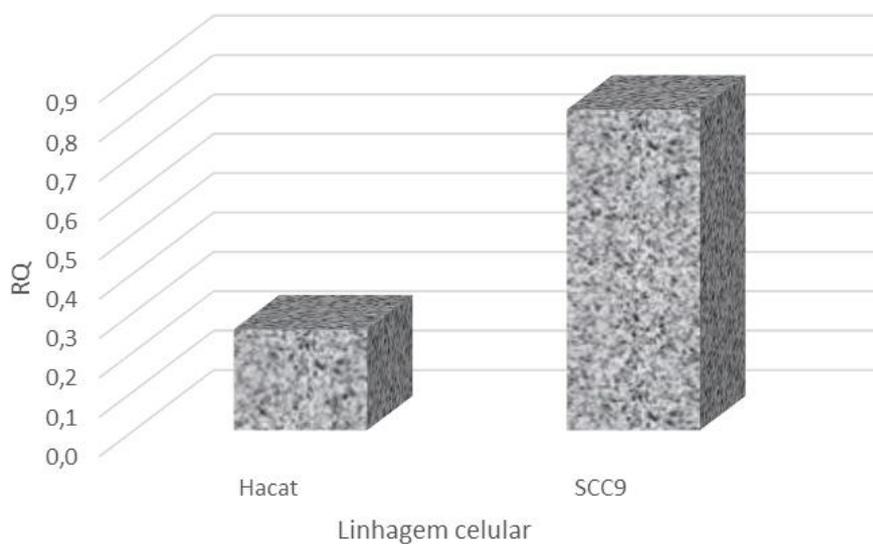


Figura 2. Quantificação relativa do gene LepR nas linhagens celulares SCC9 (carcinoma epidermóide de boca) e HACAT (queratinócito humano normal). Os dados da amplificação relativa foram normalizados em relação ao gene β -actina e a uma amostra calibradora (tecido adiposo humano).

Tabela 1. Sequências de primers utilizadas na amplificação por PCR

Gene	Sequências de primers (5'-3')
LepR	F: CGTTAAAGCTCTCGTGGCATT
	R: AATCCTCTAAGGCACATCCCAG
β -actina	F: TGCCGACAGGATGCAGAAG
	R: CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA