



EXPRESSÃO DE GENE DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE 2 EM LESÕES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

Henrique Pereira de Jesus¹, Monica Ghislaine Oliveira Alves²

1. Estudante - curso de Odontologia; e-mail: hp.henrique95@gmail.com;
2. Professor - UMC; e-mail:mgoliveiraalves@gmail.com.

Área de conhecimento: Patologia Bucal.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas. Tabagismo. Receptores Ativados por Proteinase 2.

INTRODUÇÃO

O tabagismo e o consumo frequente de álcool estão presente em 90% dos casos de CCEB, tendo consequência sinérgica, sendo os principais fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia maligna (DISSANAYAKA et al., 2012; KOONTONGKAEW, 2013). Indivíduos que fazem uso regularmente de tabaco, quando comparados a pessoas que não utiliza o mesmo, apresentam três vezes mais riscos de desenvolver câncer bucal (GANDINI et al., 2008). Os receptores ativados por protease (PARs) são receptores acoplado a proteína G (GPCRs) que exercem funções de sinalização de diversos processos celulares, e possuem papel importante na homeostasia e coagulação, tendo função na inflamação, tendo estes genes uma resposta a partir de um processo de proteases extracelulares, onde seus ativadores são a trombina, tripsina e metaloproteinase da matriz, podendo estar relacionado a evolução de células cancerígenas, tendo sua expressão excessiva em alguns tumores malignos (BOIRE et al., 2005; ARORA; RICKS; TREJO, 2007; HEMPEL; SIERKO; WOJTUKIEWICZ, 2006). Quando ativado de uma forma anormal, o gene PAR-2 acaba resultando em alguns processos fisiopatológicos como inflamação, doenças cardiovasculares e câncer, podendo colaborar no microambiente para a progressão do CCEB, pois acaba realizando o recrutamento de fibroblastos associados ao câncer, portanto a expressão deste gene pode estar relacionada a neoplasias malignas (TANG et al., 2019; AL-ERYANI et al., 2015; KANEMARU et al., 2017).

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho será avaliar a expressão do gene PAR-2 em CCEB em mucosa de pacientes usuários de tabaco e compara com mucosa com aspectos normais de pacientes não tabagistas e identificar possíveis correlações da expressão com características clínicas.



METODOLOGIA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), com número do parecer 1.033.312.

Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em duas vias. A amostra de interesse foi dividida em dois grupos. O grupo CCE fumantes foi formado por 29 amostras de CCE orais oriundos de pacientes tabagistas do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital e Maternidade Celso Pierro / PUCCAMP – Campinas, Hospital Municipal Mario Gatti, Campinas. O grupo controle fumantes, foi formado por 15 amostras de bordas epiteliais de lesões benignas provenientes de biópsias em pacientes tabagistas realizadas no ambulatório da Disciplina de Propeidêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal ICT-UNESP. Foram obtidos fragmentos teciduais dos pacientes de ambos os grupos com dimensões aproximadas de 0,5 cm³ da lesão intrabucal. Nos casos do grupo controle, os pacientes foram submetidos a algum tipo de exérese de lesão benigna, sendo utilizada a borda de tecido sadio. As amostras foram armazenadas na solução Allprotect tissue reagent (Qiagen, CA, USA) overnight a temperatura de 4°C, e após este período a -80°C. Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico extra e intrabucal. As informações sobre o estágio da doença, de acordo com o sistema TNM de classificação de tumores malignos, foram coletadas do prontuário médico dos pacientes. Os casos de CCE foram classificados histologicamente de acordo com a classificação histopatológica da OMS, que se baseia no grau de diferenciação celular (EL-NAGGAR et al., 2017). Ambos os grupos eram equivalentes em idade, sexo e hábito de fumar, sendo selecionados pacientes maiores de 18 anos, que assinaram um Termo de Consentimento Livre e esclarecido e ainda, respeitavam os critérios individuais de cada grupo, conforme apresentado no item 3.2. Pacientes que já foram submetidos a qualquer tipo de tratamento oncológico cirúrgico, radioterápico e/ou quimioterápico em qualquer órgão ou sistema não foram incluídos na amostra. Casos de amostras degradadas ou insuficientes para análise gênica ou casos com prontuários incompletos que prejudiquem a correta identificação e interpretação dos dados foram excluídos. Foram coletadas informações a respeito da frequência e quantidade consumida de cigarros, incluindo perguntas referentes ao consumo atual do cigarro, idade de início, tipo, quantidade e tempo de uso. A quantificação da carga tabágica foi realizada com o cálculo de maços-ano, que é o número de cigarros fumados por dia, dividido por vinte e multiplicado pelo número de anos que o indivíduo fumou (Reichert et al, 2008). Adicionalmente, os testes de Fagerström para Dependência à Cigarros (TFDC) e de identificação de transtorno de uso de álcool (Alcohol Use Disorder Identification Test - AUDIT) foram aplicados. As amostras foram processadas seguindo orientações dos fabricantes, sendo inicialmente armazenadas em solução Allprotect tissue reagent (Qiagen, CA, USA) a -80°C, o RNA total foi extraído usando o método do Trizol (Ambion, Inc., Carlsbad, CA, EUA) tal como recomendado pelo fabricante. Um microlitro de RNA foi usado para medir a absorvância a 260 (A260) e 280 (A280) nm em espectrofotômetro NanoDrop 1000 para cada amostra (Thermo Scientific, Wilmington). Sua integridade foi verificada por eletroforese, executada em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com coloração com brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Apenas amostras com RNA íntegro foram utilizadas. O RNA total extraído foi tratado com DNase I (Ambion Inc., Carlsbad, CA, EUA). Após o tratamento com DNase, o RNA foi transcrito em cDNA utilizando-se o Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As sequências de todos iniciadores foram confirmadas no site do NCBI/Gene Bank, as quais foram específicas para a espécie homo sapiens. Foram testados três genes de referência (ACTB, GAPDH,



TUBA6) em todos os grupos experimentais, sendo o gene TUBA6 escolhido como gene referência. O método RT-qPCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação para expressão dos genes *PAR-2*. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG. Invitrogen, Carlsbad, USA). A RT-qPCR foi realizada adicionando-se 10 µL de Super Mix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (corante de referência), 10 nM de primer forward, 10 nM de primer reverse, solução de cDNA alvo e água DEPEC livre de RNAase/DNAase para o volume final de 20 µL; com posterior incubação no aparelho StepOnePlus™ System (Life Technologies). As condições de amplificação consistiram em 50 °C por 2 minutos, seguido de 95 °C por 10 minutos e mais 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, seguidos por 60 segundos a 60 °C. Após o fim do último ciclo, as amostras foram submetidas a análise da curva de dissociação e observou-se a ausência de qualquer curva bimodal ou amplificação de sinal anormal. Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism 5.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os grupos foram comparados pelo teste t-Student. As associações entre expressão gênica e dados clínicos foram exploradas usando o coeficiente de correlação de Spearman. Considerou-se o $p < 0,05$ indicativo de diferença significativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudados 23 pacientes do grupo CCE e 9 pacientes do grupo controle, sendo excluídas amostras com qualidade ou quantidade insuficientes de RNA. O perfil clínico dos pacientes de ambos os grupos pode ser observado na tabela 1. A língua e assoalho de boca foram os locais mais comumente afetados, respectivamente.

| | | Carcinoma de células escamosas n=23 | Grupo controle n=9 |
|--|----------------------------|---|-----------------------|
| Idade (anos) | Média | 57,26 | 54,56 |
| | Intervalo | 28-80 | 38-63 |
| | Desvio padrão | 11,78 | 11,18 |
| Sexo | Masculino | 19 | 7 |
| | Feminino | 4 | 2 |
| Carga tabágica | Média | 43,43 | 57,72 |
| | Desvio padrão | 25,87 | 21,85 |
| Grau de dependência de nicotina de Fagerstrom | Média | 5,06 | 5,20 |
| | Desvio padrão | 1,82 | 1,48 |
| Risco para uso de álcool (AUDIT) | uso de baixo risco | 5 | 6 |
| | uso de risco | 12 | 2 |
| | uso nocivo | 4 | 1 |
| | provável dependência | 2 | 0 |
| Estagio da doença | I | 1 | NA |
| | II | 6 | NA |
| | III | 4 | NA |
| | IV | 12 | NA |
| Gradação histológica | Bem diferenciada | 8 | NA |
| | Moderadamente diferenciada | 9 | NA |
| | Pobrememente diferenciada | 2 | NA |
| | Sem informação | 4 | NA |



Tabela 1. Perfil clínico dos grupos estudados.

A análise da expressão do gene PAR-2 foi realizada por RT-qPCR e podemos observar na figura 1. O gene PAR-2 estudado foi regulado negativamente no grupo CCE, 4,83- (fold decrease), uma diferença de $p < 0,0001$ foi observada.

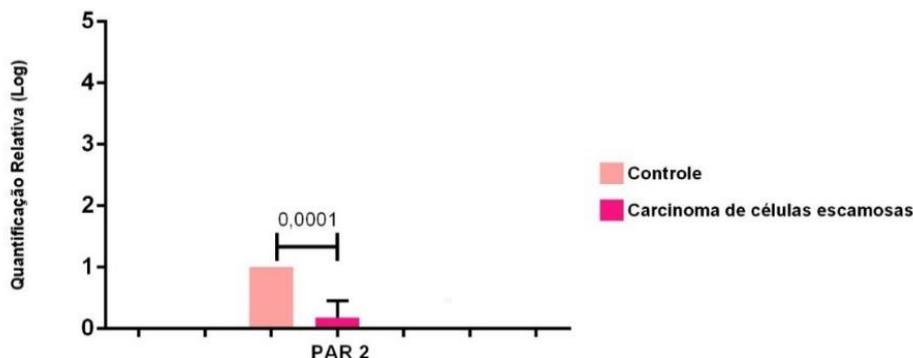


Figura 1. Expressão dos gene PAR-2 nos grupos estudados.

Na tabela 2, podemos encontrar os dados referentes a expressão do gene e os dados clínicos, onde utilizamos o teste de correlação de Spearman.

| | | Idade | Cigarros por dia | Anos de consumo | Carga tabágica | Grau de dependência de nicotina de Fagerstrom | Risco para uso de álcool (AUDIT) | Gradação histológica | Estágio da doença |
|-------------|-------------------------------------|-------|------------------|-----------------|----------------|---|----------------------------------|----------------------|-------------------|
| PAR2 | Spearman's correlation coefficients | -0,26 | -0,02 | -0,04 | 0,08 | -0,09 | 0,39 | 0,09 | 0,19 |
| | p-value | 0,22 | 0,91 | 0,85 | 0,69 | 0,68 | 0,38 | 0,67 | 0,06 |

Tabela 2. Correlação de Spearman entre dados clínicos (idade, cigarros por dia, anos de consumo, carga tabágica, escore de Fagerström para dependência de nicotina, escore de identificação de risco para transtorno de uso de álcool, gradação histológica e estágio da doença) e níveis de expressão dos genes estudados.

A proposta do presente trabalho foi avaliar a expressão do receptor ativado por protease (PAR) 2 em carcinoma de células escamosas intrabucal (CCEB) em pacientes tabagistas, correlacionando-o com dados clínicos. Observou-se subexpressão de gene PAR-2 em CCEB e não houve correção dessa expressão com dados clínicos. Segundo Uhlen et al. (2017), a resposta imune inata e adaptativa tem em seu envolvimento a participação do gene PAR-2, quando expresso promove o relaxamento da musculatura



lisa vascular, e a dilatação dos vasos sanguíneos, assim causando um aumento no fluxo sanguíneo. No estudo realizado por Li et al. (2014), onde relacionou a expressão do gene PAR-2 em estágios clínicos avançados de CCEB III e IV, notou-se o aumento da expressão deste gene nestes casos. Dado este também observado por Tang et al. (2019), onde estudou pacientes tabagistas e que também realizavam consumo de bebidas alcoólicas e com CCEB, onde a expressão do PAR-2 também se apresentou aumentada. No presente estudo, a expressão encontrou-se diminuída e tentamos correlacionar a expressão genica com características clínicas, mas não foi possível realizar esta correlação. Em um estudo realizado por Al-Eryani et al. (2015), onde observou-se amostras de CCE, que apresentava área de epitélio oral normal, displasia e carcinoma *in situ*. Os autores concluíram que a expressão do gene PAR-2 estava relacionada com o grau de malignidade que a célula epitelial apresenta, tendo a expressão aumentada em regiões que o comprometimento da célula epitelial é maior. Para Ha et al. (2014) e Kanemaru et al. (2017), durante o processo de evolução do câncer, fibroblastos associados a esta doença apresenta relevância. Observou-se maior expressão do gene PAR-2 em fibroblastos ativados no estroma do câncer, correlacionando-a com invasão infiltrativa. No presente estudo, avaliamos tecidos de CCEB invasivos, notamos que o gene PAR-2, apresentou sua expressão de forma reduzida, assim, nosso achado discorda com os estudos previamente apresentados.

CONCLUSÃO

Concluimos que a expressão do gene PAR-2 é reduzida em casos de CCEB em não foram observadas correlações entre a expressão gênica e características clínicas.

REFERÊNCIAS

- AKL, E. A. et al. The prevalence of waterpipe tobacco smoking among the general and specific populations: a systematic review. *BMC Public Health*, v. 11, n. 1, p. 244, 19 dez. 2011.
- AL-ERYANI, K. et al. Protease-activated receptor 2 modulates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Human Pathology*, v. 46, n. 7, p. 991–999, 2015.
- ARORA, P.; RICKS, T. K.; TREJO, J. A. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *Journal of Cell Science*, v. 120, n. 6, p. 921–928, 2007.
- BEGGS, A. D. et al. A study of genomic instability in early preneoplastic colonic lesions. *Oncogene*, v. 32, n. 46, p. 5333–5337, 17 nov. 2013.
- BOIRE, A. et al. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, v. 120, n. 3, p. 303–313, 2005.
- DISSANAYAKA, W. L. et al. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 113, n. 4, p. 518–525, abr. 2012.
- GANDINI, S. et al. Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, v. 122, n. 1, p. 155–164, 1 jan. 2008.



HA, S. Y. et al. The prognostic significance of cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma. PLoS ONE, v. 9, n. 6, 2014.

HASHEMIPOUR, M. A. et al. Exfoliative cytology of oral mucosa among smokers, opium addicts and non-smokers: A cytomorphometric study. Archives of Iranian Medicine, v. 16, n. 12, p. 725–730, 2013.

HEMPEL, D.; SIERKO, E.; WOJTUKIEWICZ, M. Z. Receptory aktywowane przez proteazy – biologia i rola w nowotworach złośliwych Protease-activated receptors – biology and role in cancer. Postepy Hig Med Dosw, v. 70, p. 775–786, 2016.

IRVINE, R. A.; LIN, I. G.; HSIEH, C.-L. DNA Methylation Has a Local Effect on Transcription and Histone Acetylation. Molecular and Cellular Biology, v. 22, n. 19, p. 6689–6696, 1 out. 2002.

KANEMARU, A. et al. Deregulated matriptase activity in oral squamous cell carcinoma promotes the infiltration of cancer-associated fibroblasts by paracrine activation of protease-activated receptor 2. International Journal of Cancer, v. 140, n. 1, p. 130–141, 2017.

KASSEM, N. O. F. et al. Benzene Uptake in Hookah Smokers and Non-smokers Attending Hookah Social Events: Regulatory Implications. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, v. 23, n. 12, p. 2793–2809, 1 dez. 2014.

KOONTONGKAEW, S. The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Journal of Cancer, v. 4, n. 1, p. 66–83, 2013.

LI, S. M. et al. Protease-activated receptor (PAR)1, PAR2 and PAR4 expressions in esophageal squamous cell carcinoma. Zoological research, v. 35, n. 5, p. 420–425, 2014.

MAZIAK, W. et al. The global epidemiology of waterpipe smoking. Tobacco Control, v. 24, p. i3–i12, 2015.

TANG, K.-L. et al. PAR-2 promotes cell proliferation, migration and invasion through activating PI3K/AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. Bioscience Reports, v. 0, n. June, p. BSR20182476, 2019.

UHLEN, M. et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. Science, v. 357, n. 6352, 2017.

XU, L. et al. Functional variations in the ATM gene and susceptibility to differentiated thyroid carcinoma. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 97, n. 6, p. 1913–1921, 2012.