



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



EXPRESSÃO DE PAR-1 EM LESÕES ORAIS DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Letícia Ferrari da Silva¹, Monica Ghislaine Oliveira Alves²

1. Estudante - curso de Odontologia; e-mail: letsferrari.lfs@gmail.com;
2. Professora UMC; e-mail:mgoliveiraalves@gmail.com.

Área de conhecimento: Patologia Bucal.

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

INTRODUÇÃO

O câncer bucal apresentou 300.000 novos casos (2,1% do total mundial dos casos de câncer) e 145 000 mortes (1,8% do total mundial de óbitos dos cânceres analisados) em 2012. Deste total, 77% das mortes se apresentaram em regiões menos desenvolvidas, e há prevalência de 2:1 dos homens em relação às mulheres (FERLAY et al., 2015). No Brasil, no ano de 2016, foi estimado 11.400 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4350 em mulheres. A mortalidade em 2018 chegou a 4974 e para 2020, é previsto a incidência de 11.200 casos do câncer de boca em homens no país (INCA, 2020). No estudo do câncer, a observação dos marcadores moleculares mostra-se importantíssimos em uma abordagem inicial, e no prognóstico do caso, dada a grande incidência da doença e sua taxa de letalidade (CASTRO et al., 2019; FERLAY et al., 2019). Entender a associação causal entre doenças e genes tem sido um importante objetivo da biologia. Nesse contexto, foi possível descobrir que existem genes mais significantes do que outros, devido sua ação em processos biológicos essenciais, além da maior ou menor expressão em uma determinada doença (KUMAR et al., 2017). Os Receptores Ativados por Protease (PARs) são receptores acoplados a proteína G, que quando ativados pela clivagem proteolítica extracelular emitem um sinal transmembrana através de seus ligantes. São conhecidos quatro tipos de PARs em mamíferos (PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4), e estes possuem importante papel nos processos de inflamação e coagulação, sendo responsáveis pelas respostas de agregação plaquetária. Além da ativação das plaquetas, os PARs são as vias de ativação de outros componentes importantes no contexto da inflamação, como células endoteliais, músculo liso, neurônios e outros tipos celulares. Estes receptores fazem a ligação entre lesões celulares e recrutamento de plaquetas, leucócitos e após a transdução, as proteínas responsáveis pela busca de injúrias e infecção. Neste processo, a trombina é a principal protease responsável, e esta, tem grande preferência ao receptor PAR-1 (COUGHLIN, 2005). Os PARs estão presentes em diversos processos fisiológicos e patofisiológicos (HEUBERGER e SCHUEPBACH, 2019) e estão também relacionados com o processo de progressão tumoral, embora como ocorra este processo não estar totalmente elucidado. Estudos aprofundados a respeito desse receptor possibilitaria o desenvolvimento de drogas que possam atuar nos PARs, impedindo progressão e metástase de determinados tumores, visto que a literatura tem mostrado relação



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



entre o processo de coagulação e progressão neoplásica (ARORA; RICKS; TREJO, 2007; HEMPEL; SIERKO; WOJTUKIEWICZ, 2016).

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão do gene *PAR-1* em carcinoma de células escamosas de pacientes tabagistas bem como comparar a expressão do mesmo em mucosa com aspecto de normalidade de pacientes do grupo controle, observando se há associação entre a expressão deste gene com o carcinoma de células escamosas intrabucal e as características clínicas do CCE oral.

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, descrito abaixo: 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 Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal ICT-UNESP. 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, carga tabágic. 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). Um microlitro de RNA foi usado para medir a absorbância a 260 (A260) e 280 (A280) nm e a integridade foi verificada por eletroforese, executada em gel de agarose 1% (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). O método RT-



qPCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG. Invitrogen, Carlsbad, USA). 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.

Tabela 1. Perfil clínico dos grupos estudados

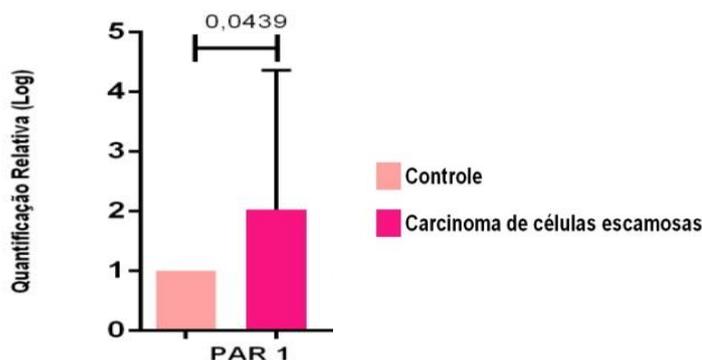
		Carcinoma de células escamosas n=23	Grupo controle n=9
Idade (anos)	Média	57,26	54,56
	Intervalo	28-80	38-63
	Desvio padrão	11,78	11,18
Sexo	Masculino	19	7
	Feminino	4	2
Carga tabágica	Média	43,43	57,72
	Desvio padrão	25,87	21,85
Grau de dependência de nicotina de Fagerstrom	Média	5,06	5,20
	Desvio padrão	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 dependencia	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

A expressão do gene *PAR-1* nos grupos estudados foi analisada por RT-qPCR. O gene foi regulado positivamente, 0,49+ (fold increase) no grupo CCE, demonstrado na figura 1. Diferença significativa foi observada entre os grupos para o gene *PAR-1* ($p = 0,0439$). Houve



correlação entre a expressão do gene e a idade, o risco para uso de álcool e o estágio da doença.

Figura 1. Expressão do gene *PAR-1* nos grupos estudados



Pouco se sabe sobre expressão de PARs e proteases em tecidos humanos doentes (OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004). Diante disso, o presente trabalho visou correlacionar a expressão de PAR-1 em tecidos saudáveis e em tecidos acometidos pelo CCE de pacientes tabagistas. Observou-se que este receptor apresentou correlação com variáveis clínicas, idade, estágio da doença e risco em pacientes etilistas. Além disso, houve superexpressão do gene naqueles portadores de CCE. As células tumorais expressam PARs e o microambiente tumoral possui diversas proteases que os podem ativar. Assim como outros autores, Ossovskaya e Bunnett (2004) concordam que as células malignas são responsáveis pela secreção de tripsina e trombina, colaborando na proliferação e em processos metastásicos como invasão celular, degradação da matriz extracelular, angiogênese e remodelação tecidual. Proteases e PARs demonstram importante papel na doença e podem ser o alvo nas terapias, pois esses receptores modulam muitas respostas importantes, incluindo coagulação, proliferação, sobrevivência, inflamação, neurotransmissão e dor. Além disso, PARs exercem papel anti-inflamatório e protetor em determinadas situações. As proteases que ativam os PARs são geradas em situações de trauma, hemostasia, inflamação e formação do tumor, logo, a função dos PARs é alterada durante o processo da doença.

Os resultados encontrados no presente estudo concordam com as conclusões de Li et al. (2014), que em estudo semelhante, pela análise por RT- qPCR em pacientes nunca submetidos a tratamento radioterápico ou quimioterápico, na análise a expressão de *PAR-1* em carcinoma de células escamosas no esôfago, afirmaram que há aumento significativo quando comparado a tecido esofágico humano em normalidade. Em análise histoquímica no câncer de pulmão de células não pequenas, realizado por Lin et al. (2017), foi visto que no estroma tumoral há superexpressão de *PAR-1* quando comparado ao tecido sadio, sendo este fato independente do tipo, estágio, estado de diferenciação patológica do tumor, progressão da doença e sobrevida do paciente, concluindo que a regulação positiva de expressão deste gene se dá principalmente em células endoteliais, macrófagos e fibroblastos estromais. Em contrapartida, Yang et al. (2013) diz haver correlação entre a expressão de *PAR-1* e metaloproteinases da matriz-1 (*MMP-1*) com o estágio avançado da doença, seu poder



metastático, e recorrência positiva. Além disso, a superexpressão associada dos dois citados pareceu contribuir negativamente na sobrevida dos pacientes com carcinoma nasofaríngeo.

As metaloproteinases da matriz são responsáveis pela clivagem de proteínas da matriz extracelular em diversos processos, inclusive na progressão de tumores. O eixo de sinalização entre as *MMP-1* e *PAR-1* promove a angiogênese, acelera a tumorigênese e a invasão do tumor em carcinoma epidermóide oral e carcinoma nasofaríngeo, além de que pacientes com superexpressão de *PAR-1* e *MMP-1* possuem um pior prognóstico frente aqueles com baixas expressões dos mesmos. Além disso, estudos mostram que pode haver relação com a metástase, embora de forma não conclusiva (FAN et al., 2015; YANG et al., 2013). Em nosso estudo, observamos correlação positiva com estágio da doença, ou seja, observamos maior expressão em estágios mais avançados. Adicionalmente, Boire et al. (2005) observaram que a presença do receptor *PAR-1* demonstrou em carcinoma de mama de camundongos um aumento na invasão e crescimento celular no processo neoplásico, mostrando que este receptor também pode ser responsável pela progressão e metástase em tumores invasivos.

CONCLUSÃO

Concluimos que há superexpressão de *PAR-1* nos pacientes com CCE, além de correlacionarmos sua expressão com a idade do paciente, o risco do uso do álcool e o estágio da doença.

REFERÊNCIAS

ARORA, P.; RICKS, T. K.; TREJO, J. A. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. **Journal of Cell Science**, EUA, v. 120, n. 6, p. 921–928, 2007.

BOIRE, A. et al. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. **Cell**, [s.l.], v. 120, n. 3, p. 303–313, 2005. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2804%2901210-3>. Acesso em: 13 set. 2020.

CASTRO, Taciana Padilha; PENHA, Ricardo Cortez Cardoso; BUEXM, Luisa Aguirre; DE CARVALHO, Flávia Nascimento; OLIVEIRA, Raquel de Vasconcellos Carvalhaes; AGAREZ, Fernando Vaz; PINTO, Luciana Wernersbach; CARVALHO, Denise P. Molecular Predictors for Advanced Papillary Thyroid Carcinoma Recurrence. **Frontiers in Endocrinology**, [s.l.], v.10, n.839, p. 1-9, 05 dez. 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00839/full>. Acesso em: 09 mai. 2020.

COUGHLIN, SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. USA, **J Thromb Haemost**, v. 3, n., p. 1800-1814, 2005.

EL-NAGGAR, A. K. et al. Odontogenic and maxillofacial bone tumours. WHO classification of Head and neck Tumors 2017, p. 109–111, 2017.



FAN, H. X. et al. Expression of MMP-1/PAR-1 and patterns of invasion in oral squamous cell carcinoma as potential prognostic markers. **OncoTargets and Therapy**, v. 8, p. 1619–1626, 2015

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 144, n.8, p. 1941-1953, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.31937>. Acesso em: 09 mai. 2020.

FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; DIKSHIT, Rajesh; ESER, Sultan; MATHERS, Colin; REBELO, Marise; PARKIN, Donald Maxwell; FORMAN, David. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v.136, n.5, p. E359-E386, 01 mar. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29210>. Acesso em: 09 mai. 2020.

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.

Heuberger, Dorothea M.; Schuepbach, Reto A. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. **Thromb J**, Suíça, v. 17, n.4, p. 01-24, 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6440139/pdf/12959_2019_Article_194.pdf. Acesso em: 22 set. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Doenças relacionadas ao tabagismo. **INCA**, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/doencas-relacionadas-ao-tabagismo>. Acesso em: 18 mai. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Estatísticas de câncer. **INCA**, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 18 mai. 2020.

KUMAR, Ravindra; SAMAL, Sabindra K; ROUTRAY, Samapika; DASH, Rupesh; DIXIT, Anshuman. Identification of oral cancer related candidate genes by integrating protein-protein interactions, gene ontology, pathway analysis and immunohistochemistry. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 01-09, 30 maio. 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-02522-5>. Acesso em: 10 mai. 2020.

LI, Si-Man; JIANG, Ping; XIANG, Yang; WANG, Wei-Wei; ZHU, Yue-Chun; FENG, Wei-Yang; LI, Shu-De; YU, Guo-Yu. Protease-activated receptor (PAR)1, PAR2 and PAR4 expressions in esophageal squamous cell carcinoma. **Zoological Research**, China, v.35, n.5, p. 420–425, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4790359/pdf/ZoolRes-35-5-420.pdf>. Acesso em 30 set. 2020.

LIN, C. et al. Potential importance of protease activated receptor (PAR)-1 expression in the tumor stroma of non-small-cell lung cancer. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017.



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC

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**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001

OSSOVSKAYA, V. S.; BUNNETT, N. W. Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 579–621, 2004. Disponível em:

https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00028.2003?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org#. Acesso em: 30 set. 2020.

REICHERT, J. et al. Diretrizes Tabagismo. v. 34, n. 10, p. 845–880, 2008.

RENTOFT, M. et al. Protein kinase C- β inhibitor treatment attenuates hepatic ischemia and reperfusion injury in diabetic rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 3, p. 419–423, 2016.

YANG, R. et al. Combined upregulation of matrix metalloproteinase-1 and proteinase-activated receptor-1 predicts unfavorable prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. **Oncotargets and Therapy**, v. 6, p. 1139–1146, 2013.