

## AÇÃO DA LEPTINA SOBRE O EFEITO TERAPÊUTICO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

**Autores:** GUILHERME VELOSO RAMOS, ELIANE MACEDO SOBRINHO SANTOS, EMISAEEL STÊNIO BATISTA GOMES, ELOÁ MANGABEIRA SANTOS, ROGÉRIO GONÇALVES DA ROCHA, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, LUCYANA CORNCEIÇÃO FARIAS

### Introdução

O carcinoma epidermoide é a neoplasia maligna mais frequente em mucosa bucal (DEDIVITIS *et al.*, 2004). A etiopatogênese do carcinoma epidermoide de boca (CEB) é atribuída a fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, particularmente relacionadas ao estilo de vida, como o tabagismo e etilismo (SEETHALAKSHMI, 2013).

A leptina é um componente da regulação da homeostase energética corporal. Estudos têm associado a expressão desse hormônio e seu receptor ao desenvolvimento de cânceres em diversos sítios anatômicos, tais como estômago, colo retal e mama (FRANKENBERRY *et al.*, 2006; CHIA *et al.*, 2007; CASCIO *et al.*, 2008). Estudo recente apontou uma associação relevante da leptina no desenvolvimento e progressão da carcinogênese de boca (SOBRINHO SANTOS, E. M. *et al.*, 2017)

A radioterapia (RT) é uma importante modalidade terapêutica para o CEB. Os pacientes com CEB avançado necessitam de RT adjuvante, sendo ela pré ou pós-operatória (VIKRAM, 1998).

Um estudo demonstrou que a radioterapia levou a uma diminuição dos níveis de leptina em casos de câncer de cabeça e pescoço (OZSOY S. *et al.* 2015). No entanto, não é bem entendido se o aumento dos níveis de leptina é capaz de interferir sobre o efeito do tratamento do CEB.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a resposta fenotípica de linhagens celulares de CEB tratadas com leptina e expostas à radiação ionizante terapêutica.

### Material e métodos

#### A. Cultivo celular, tratamento com leptina e radiação ionizante

As linhagens celulares imortalizadas de CEB, SCC-9 e SCC-4 (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 leptina (Invitrogen, USA), por 72 horas. Os tratamentos com radiação ionizante foram realizados no dia da administração da última dose de leptina, através da exposição das células em semi-confluência. As células foram expostas à dose de 6Gy de cobalto-60 (gray: unidade internacional de dose de radiação ionizante), utilizando-se o equipamento Telecobalt MachineTheratron Phoenix Philips SR 7510 (Eindhoven, Holanda), a uma distância fonte-campo de 70cm. Após 72 horas, foram realizados os ensaios fenotípicos, abaixo descritos. Os testes foram realizados em triplicata, em três momentos independentes.

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

Uma densidade de  $1 \times 10^5$  células foi plaqueada em placas de 6 poços e submetida aos tratamentos experimentais com leptina e exposição à radiação. Após os tratamentos, foi mensurada a viabilidade celular, através do método de contagem de células por exclusão de azul de trypan.

#### C. Ensaio de migração

Uma de densidade  $8 \times 10^4$  células foi incubada em placas de 12 poços, a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Em seguida, foram tratadas com leptina durante 72 horas. Antes da exposição à radiação, utilizando uma ponteira de 200µl, foi criada uma área livre de células, para analisar a capacidade de migração das células submetidas aos tratamentos (CHAN, S. W. *et al.* 2008). Em seguida, as células foram irradiadas e a taxa de migração foi mensurada após 72 horas. Um microscópio invertido Olympus IX81 (Olympus, Center Valley, PA, EUA) acoplado à câmera SC30 (Olympus, Center Valley, PA, EUA) foi usado para captura de imagens, e a área coberta por células migratórias foi quantificada usando o software ImageJ (NIH; Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij/>).

#### D. Ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias celulares

As células foram semeadas em placas de 6 poços e expostas aos tratamentos experimentais. Após a irradiação, as células foram mantidas em estufa por 72 horas. Em seguida, as células foram tripsinizadas e plaqueadas novamente em placas de 6 poços com uma densidade de  $5 \times 10^2$  células. Foram mantidas em meio de crescimento durante 10 dias para formar colônias. Em seguida, as colônias (cluster contendo  $\geq 50$  células) foram fixadas com 70% de etanol, coradas com 2% de Giemsa e quantificadas pelo software ImageJ. O controle não irradiado foi utilizado para a normalização da fração sobrevivente de grupos experimentais (FRANKEN N.A. *et al.* 2006).

#### E. Análises estatísticas

Os resultados foram tabulados e analisados no software estatístico SPSS®, versão 18.0, para Windows. Foi utilizado o teste Anova One-Way, com nível de significância  $p < 0,05$ .



## Resultados e discussão

### A. Leptina reduziu os efeitos supressivos da irradiação sobre o fenótipo neoplásico de células de CEB.

Para avaliar se a leptina interfere sobre o efeito de radiação ionizante (IR) em células de CEB, foram realizados os ensaios de viabilidade e migração celular. A leptina aumentou a proliferação celular, apesar do efeito supressor induzido pela radiação. Estudos mostraram que alterações na expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular, apoptose, angiogênese e metabolismo celular mostraram afetar radiosensibilidade de pacientes com câncer de cabeça e pescoço (BLATT, S. *et al.*, 2016). (Fig. 1)

O efeito de radiação na migração celular também foi revertido pela leptina. Enquanto o grupo IR apresentou menor percentual de migração, o tratamento com leptina acentuou a capacidade de migração das células de CEB expostas à radiação (Fig. 2).

### B. Leptina reduziu a sensibilidade das células de CEB à radiação ionizante, aumentando a formação de colônias

Para testar o efeito da leptina na resposta/sensibilidade das células de CEB à radiação, foi analisada a formação clonogênica. As células tratadas com leptina apresentaram baixa sensibilidade à radiação, formando mais clones celulares do que o grupo IR (Fig. 3). Assim, a leptina foi capaz de favorecer radiorresistência das células de CEB, comprometendo o potencial antineoplásico da radiação ionizante. Tendo em vista a ação da radiação ionizante, promovendo a morte das células neoplásicas através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), sugere-se que a leptina possa reduzir a formação das EROs, favorecendo, assim, a sobrevivência das células.

## Considerações finais

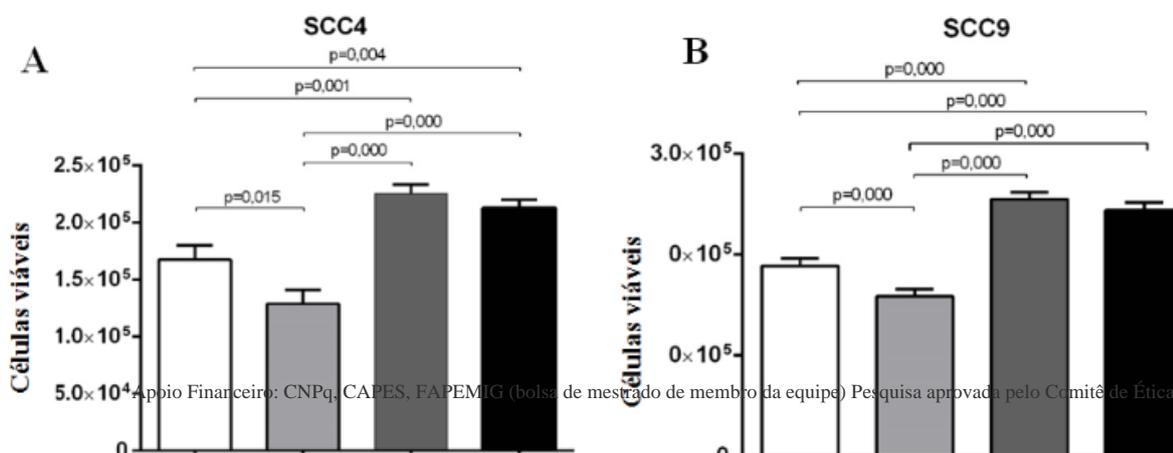
Os achados apontam que a leptina pode aumentar a resistência das células à radiação ionizante, reduzindo os efeitos supressivos da irradiação sobre o fenótipo neoplásico de células de carcinoma epidermoide de boca. A condução de novos estudos funcionais *in vivo* levará a um maior entendimento da ação da leptina sobre o efeito da radioterapia, especialmente em indivíduos acometidos pelo CEB e que apresentam níveis aumentados desse hormônio, como nos quadros de obesidade.

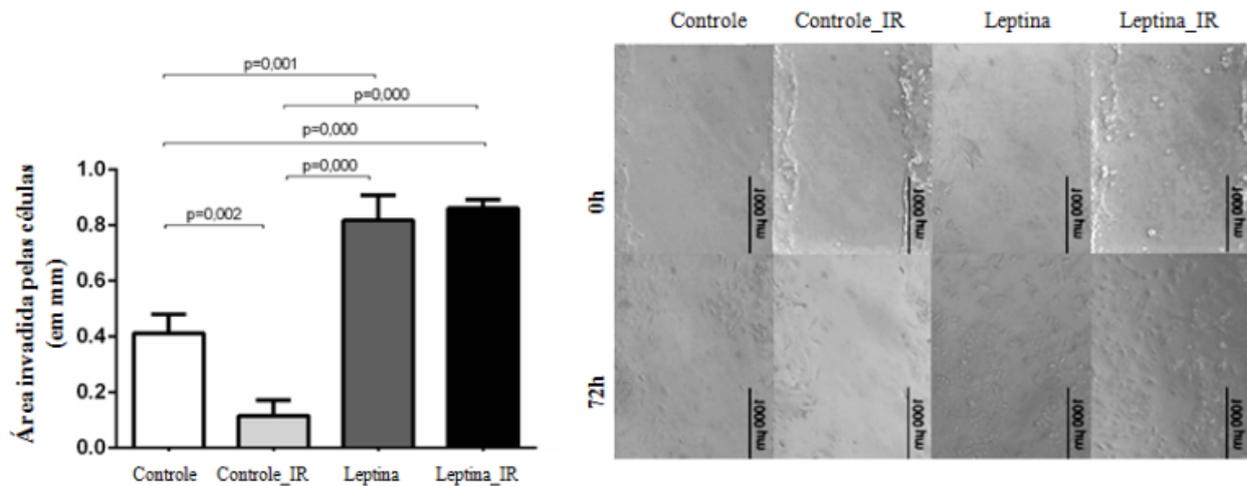
## Agradecimentos

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.

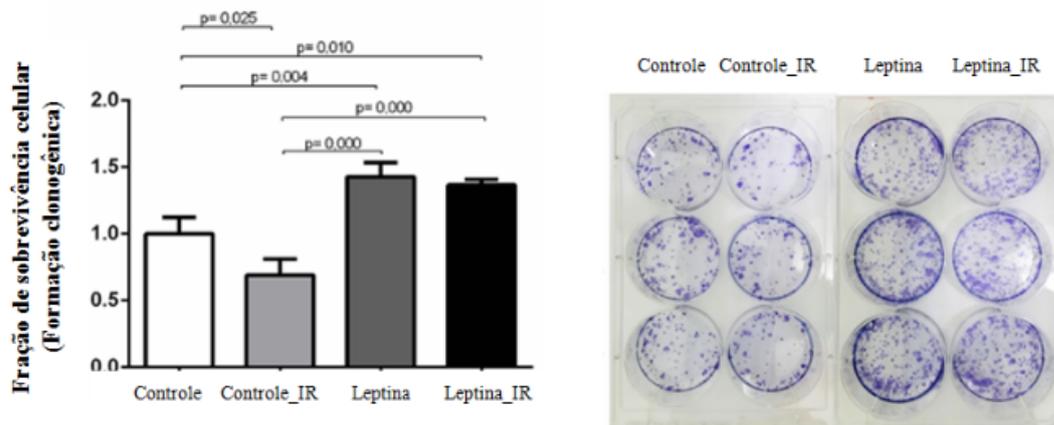
## Referências bibliográficas

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- SOBRINHO SANTOS, E. M. *et al.* Leptin acts on neoplastic behavior and expression levels of genes related to hypoxia, angiogenesis, and invasiveness in oral squamous cell carcinoma. **Tumour Biol**, v. 39, n. 5, p. 1010428317699130, 2017.
- VIKRAM, B. Adjuvant therapy in the head and neck cancer. **CA Cancer J Clin**, United States, v.48, n.4, p.199-209, 1998.
- OZSOY S. *et al.* The association between depression, weight loss and leptin/ghrelin levels in male patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. **Gen Hosp Psychiatry**; v.37, n.1, p.31-35, 2015.
- FRANKEN N.A. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**; v.1, n.5, p.2315-2319, 2006.
- Chan, S. W. *et al.* A role for taz in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. **Cancer Res**, v.68, n.8, p.2592-2598, 2008.
- BLATT, S. *et al.* Lactate as a predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years. **Clin Oral Investigation**, v.20, n.8, p.2097-2104, 2016.





**Figura 2.** Alterações na migração de células SCC9 tratadas com leptina 100 ng/mL e expostas a radiação ionizante e grupos não expostos. Alterações na viabilidade celular das linhagens SCC4 (A) e SCC9 (B), tratadas com leptina 100 ng/mL por 72 horas e expostas a 6Gy de radiação com cobalto-60. Grupos experimentais: Células livres de tratamento (Controle), Células expostas à radiação ionizante (Controle\_IR), Células tratadas com Leptina (Leptina), Células tratadas com Leptina e expostas à radiação ionizante (Leptina\_IR). Teste Anova One-Way, Significância estatística:  $p < 0,05$



**Figura 3.** Representação gráfica e imagem ilustrativa de ensaio de formação clonogênica de células SCC9 tratadas com leptina 100 ng/mL por 72 horas e expostas a 6Gy de radiação com cobalto-60. Grupos experimentais: Células livres de tratamento (Controle), Células expostas à radiação ionizante (Controle\_IR), Células tratadas com Leptina (Leptina), Células tratadas com Leptina e expostas à radiação ionizante (Leptina\_IR). Teste Anova One-Way, Significância estatística:  $p < 0,05$