

Juste, M.F.¹; Lopes-Santos, L.¹; Rodrigues, A.N.^{1,2}; Cajazeiro, D.C.¹; Coletta, R.D.³; Oliveira, C.E.⁴; Augusto, T.M.¹; Cervigne, N.K.^{1*}

1. Laboratório de Biologia Molecular e Cultura Celular (LBMCC), Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ);
 2. Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ), Jundiaí, SP;
 3. Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil;
 4. Departamento de Patologia Geral da Universidade Feral de Alfenas (UNIFAL), Alfenas, MG;
- * Autor Correspondente: nilva.cervigne@gmail.com

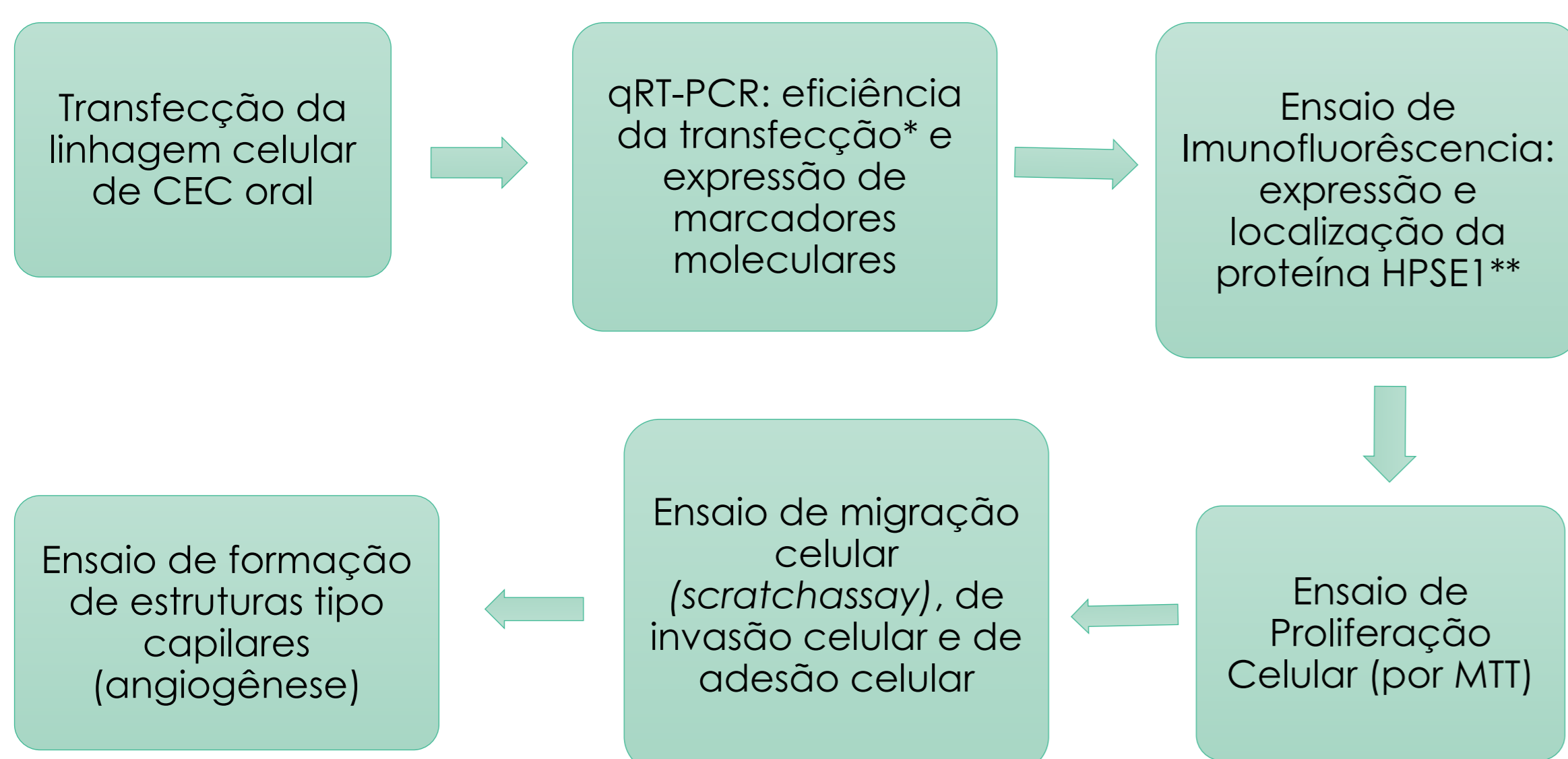
INTRODUÇÃO

Os cânceres orais representam um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. O Carcinoma Espinocelular Oral (CEC) é a forma mais prevalente dos cânceres da cavidade oral, e pode ser bastante agressivo e metastático, com pobre prognóstico e baixa taxa de sobrevivência. A formação de metástases depende principalmente da habilidade de células tumorais invadirem a membrana basal, em um processo que envolve enzimas capazes de degradarem os componentes da matriz extracelular (MEC). A heparanase-1 (HPSE1) é uma enzima com atividade endoglicosídica que cliva as cadeias laterais de heparan sulfato (HS) das proteoglicanas, uma das principais constituintes da MEC, e por isso uma forte candidata a biomarcador de prognóstico associado a invasão e metástase do câncer.

OBJETIVOS GERAIS

Considerando o papel de HPSE1 na invasão e metástase tumoral, o propósito desse estudo foi caracterizar os níveis de expressão da HPSE1 em linhagem de câncer oral, e correlacionar os seus níveis de expressão com seu papel funcional no processo de angiogênese tumoral do CEC oral.

MATERIAL E MÉTODOS



RESULTADOS

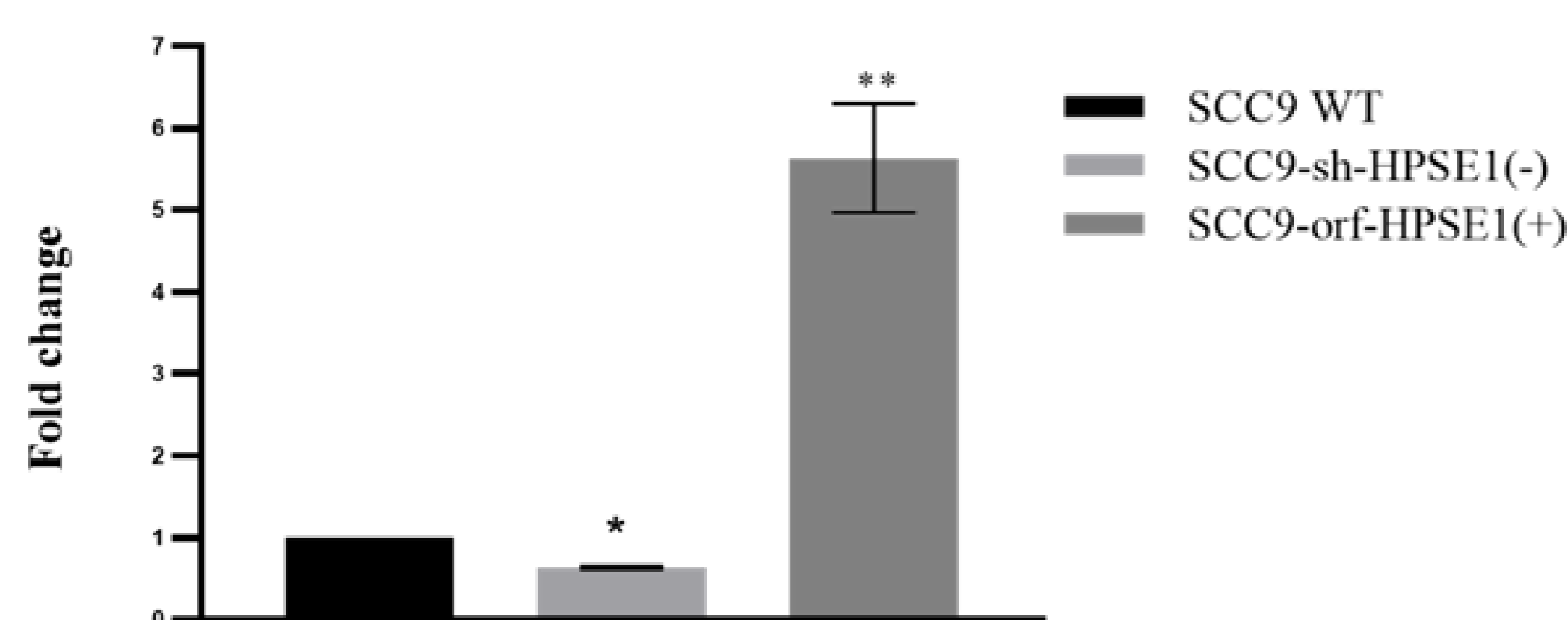


FIGURA 1 - Análise de expressão gênica de HPSE1 pela técnica de qRT-PCR. SCC9 (WT), linhagem tumoral controle de transfecção; SCC9-sh-HPSE1(-), clone para inibição/silenciamento de HPSE1; SCC9-orf-HPSE1(+), clone para superexpressão gênica de HPSE1. A análise de expressão relativa por ddCt foi realizada utilizando o controle endógeno 18SR como normalizador da reação. As expressões das amostras alvos (clones) foram comparadas com a referência, SCC9 (wildType), cuja expressão normal de HPSE1 = 1.

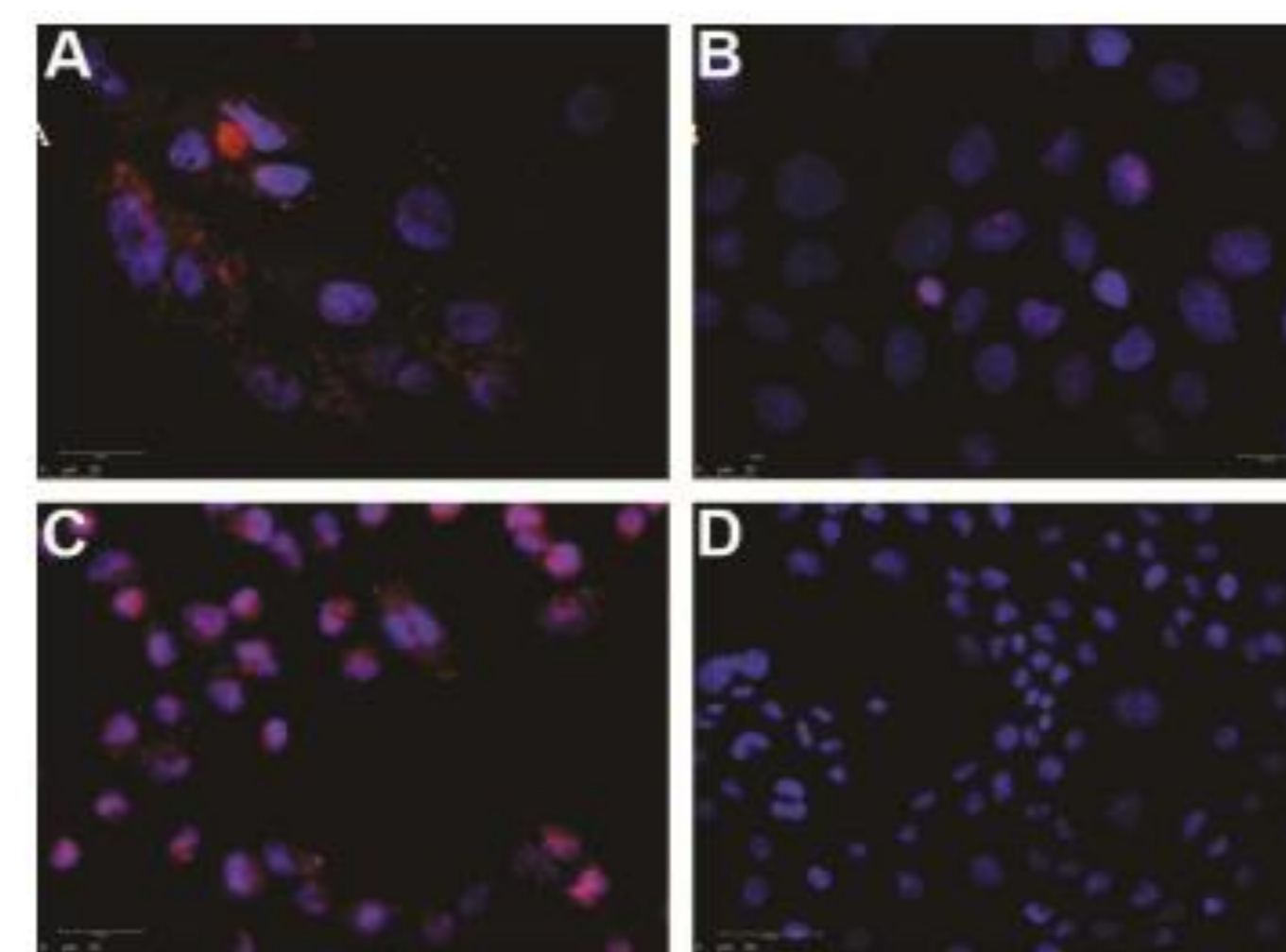


FIGURA 2 - Técnica de Imunofluorescência. (A), (B) e (C) Marcação com anticorpo HPA-conjugado na linhagem parental SCC9WT, no clone de inibição SCC9-sh-HPSE1(-) e no clone de superexpressão SCC9-orf-HPSE1(+), respectivamente. (D) Controle negativo da reação em linhagem parental SCC9. O ensaio foi realizado com o anticorpo primário anti-HPA (1:250), em conjugação com o anticorpo secundário correspondente AntirabbitAlexaFluor 546 (1:1000);

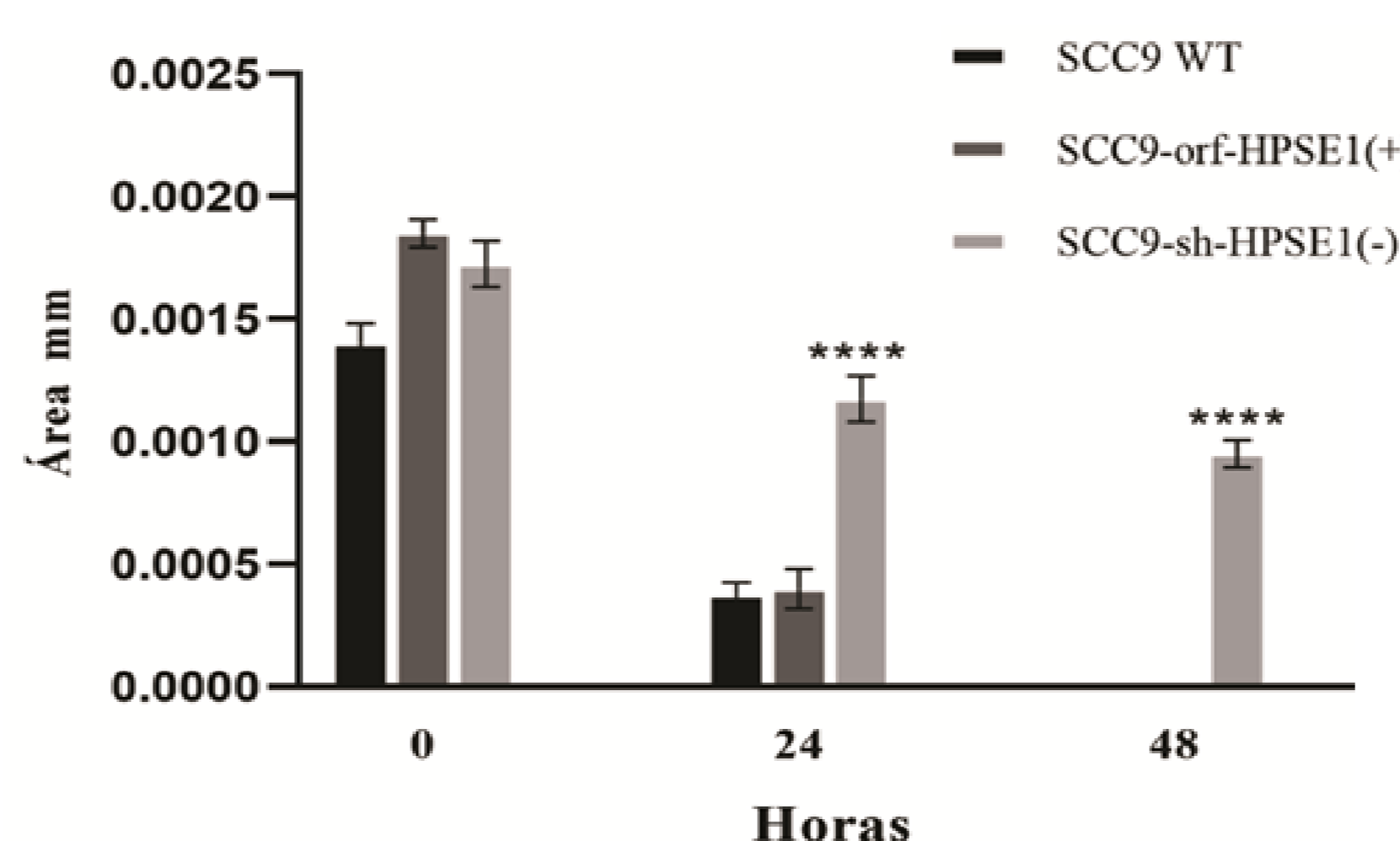


FIGURA 4 - Ensaio de ranhura ou migração celular (Scratch Assay). Os resultados estão expressos em área total remanescente no interior da fenda primária analisada por software Motoc 2.0. O gráfico compila a análise de triplicata experimental. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido de teste Tukey, onde *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

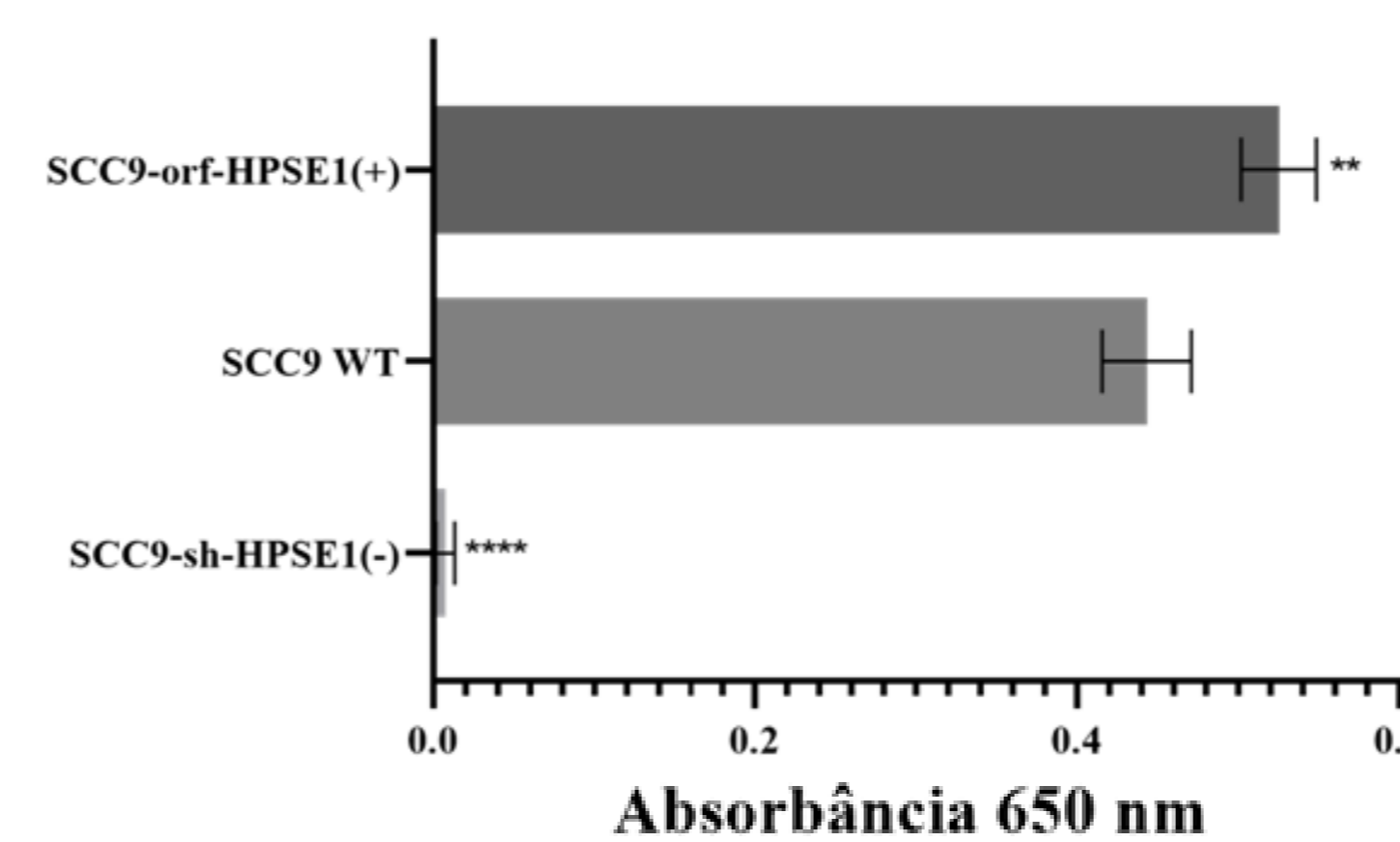


FIGURA 6 - Ensaio de adesão celular. O gráfico mostra, em valores de absorbância 650 nm, das células aderidas a superfície revestida da placa e coradas com Azul de Toluidina. Os valores compilam dados médios +/- desvio padrão relativizados ao 'branco' da análise em triplicata experimental. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido de teste Tukey, significantes para *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

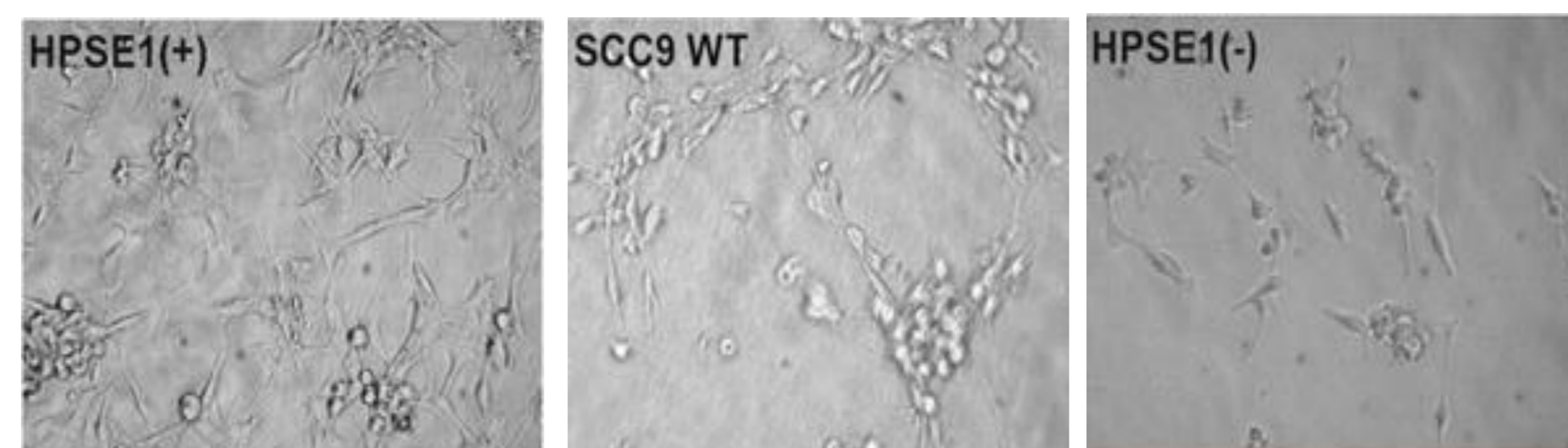


FIGURA 8 - Co-cultura em 2D de células HUVEC sobre camada de Miogel. 10⁴ células HUVEC adicionadas de meio pré-condicionado das linhagens malignas CEC oral, e seus respectivos clones, após 12 horas de experimento: HUVEC em meio pré-condicionado da linhagem parental SCC9 WT (200x); HUVEC em meio pré-condicionado do clone de inibição de HPSE1, SCC9-sh-HPSE1(-) (200x); HUVEC em meio pré-condicionado do clone de superexpressão de HPSE1, SCC9-orf-HPSE1(+) (200x).

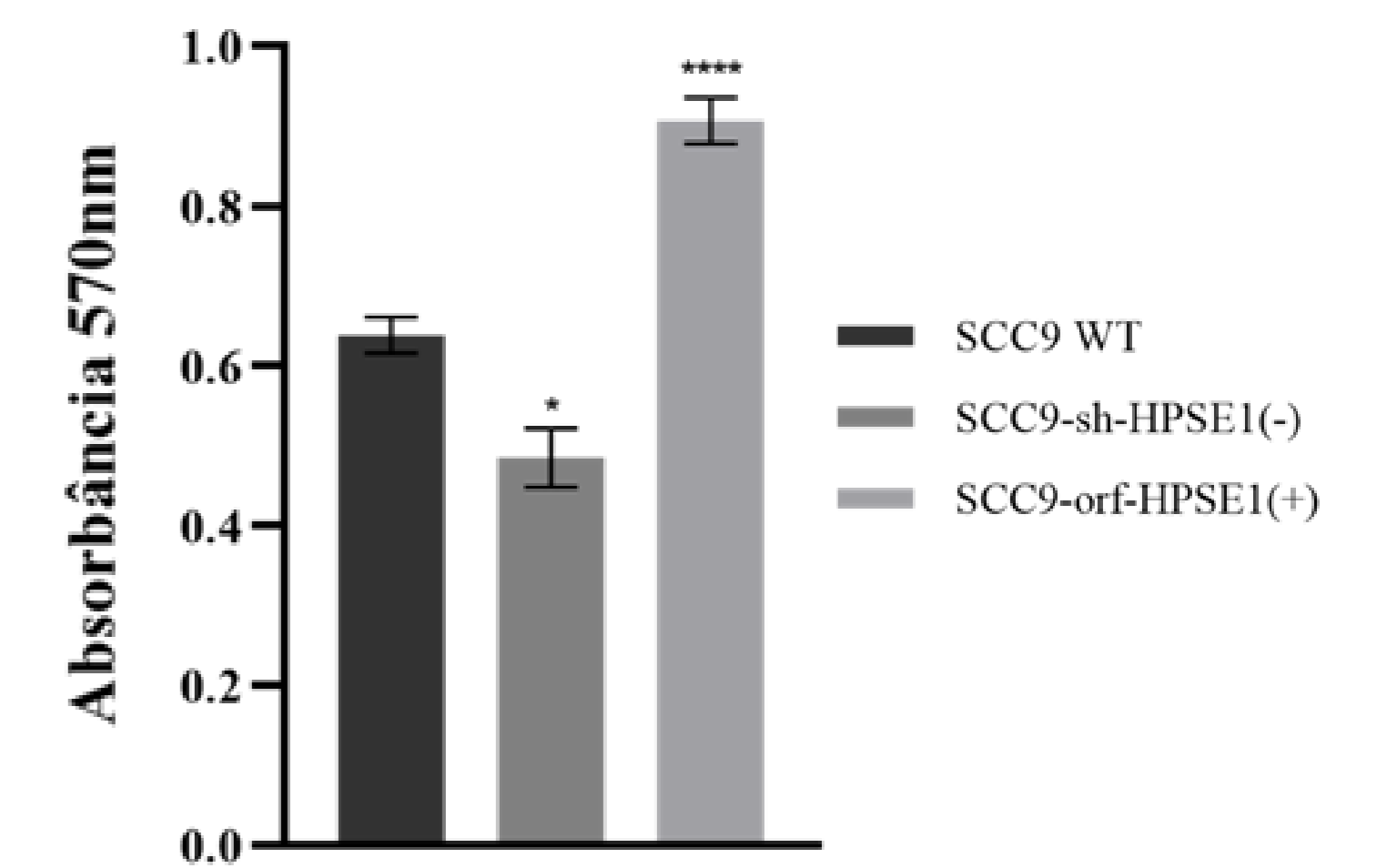


FIGURA 3 - Ensaio de proliferação celular da linhagem parental SCC9 WT, comparada com seu clone de inibição/silenciamento SCC9-sh-HPSE1(-) e o clone de superexpressão SCC9-orf-HPSE1(+). A significância estatística desta análise foi obtida pelo teste estatístico não paramétrico ANOVA One-Way e multi-comparação pelo teste (p < 0.05).

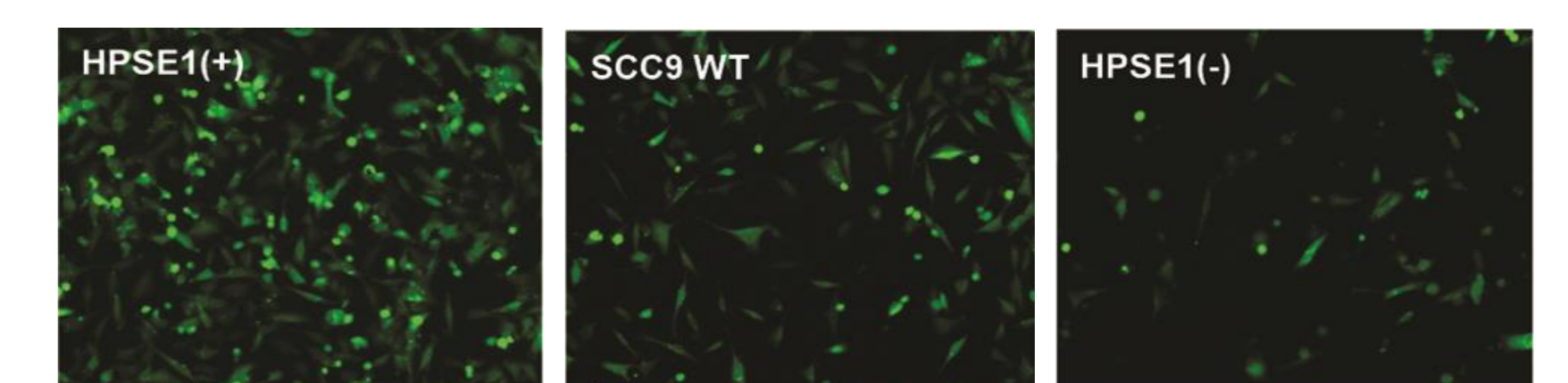
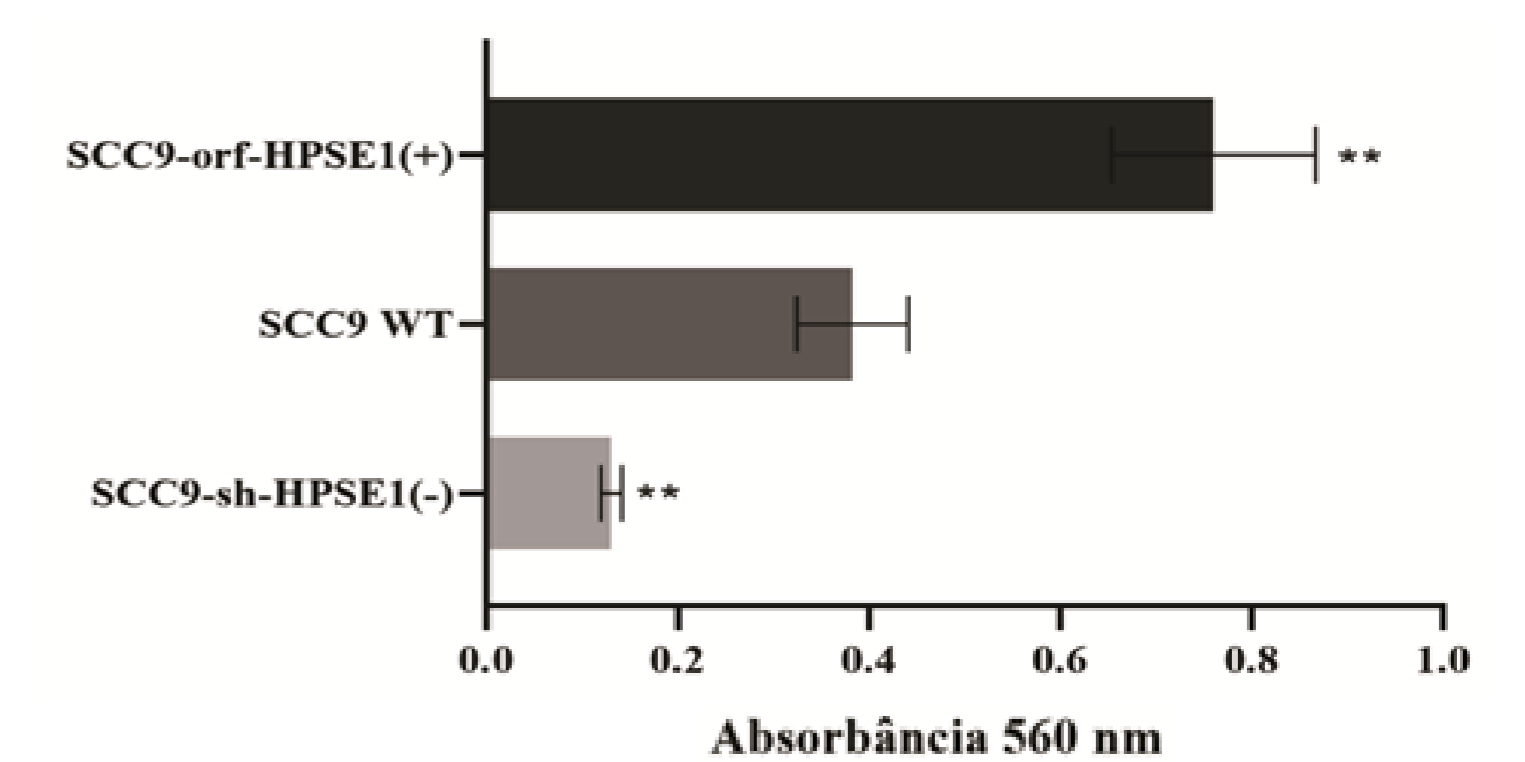


FIGURA 5 - Ensaio de invasão celular. (A) Fotomicrografias representativas da linhagem celular SCC9 WT de CEC oral e seus respectivos clones de inibição, SCC9-sh-HPSE1(-), e de superexpressão, SCC9-orf-HPSE1(+), da enzima HPSE1. (B) Análise da triplicata experimental dos valores de absorbância (650nm) do corante azul de toluidina utilizado para mensurar o número de células que invadiu a matriz e aderiu no poro do inserto do tranwell. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido de teste Tukey, onde *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

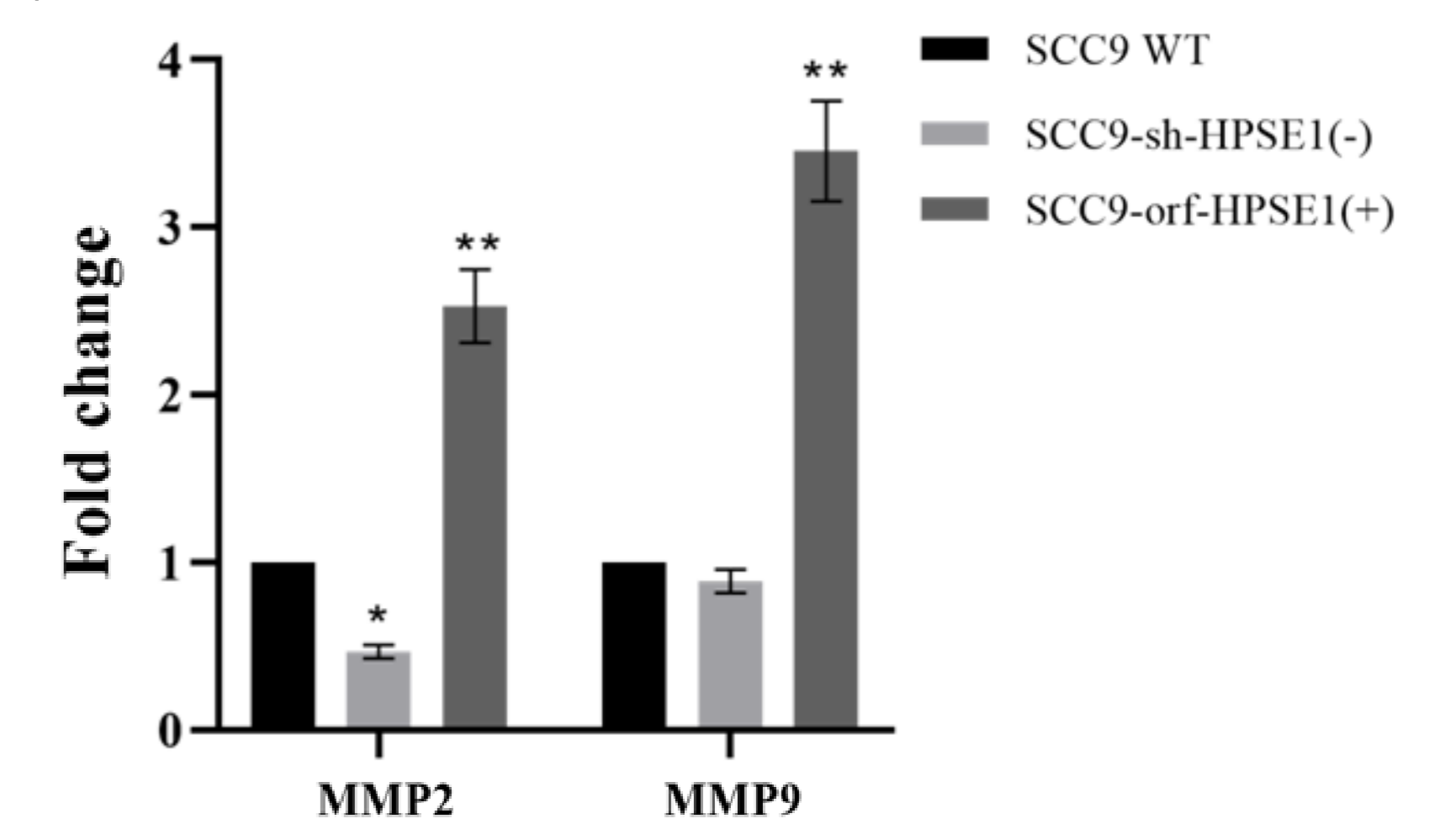


FIGURA 7 - Análise de expressão gênica de enzimas denominadas de metaloproteinases de matriz extracelular (MMP), MMP2 e MMP9, marcadores canônicos das vias de degradação de MEC, associados com invasão e metástase tumoral, pela técnica de qRT-PCR. A análise de expressão relativa por ddCt foi realizada utilizando o gene controle endógeno 18SR como normalizador da reação.

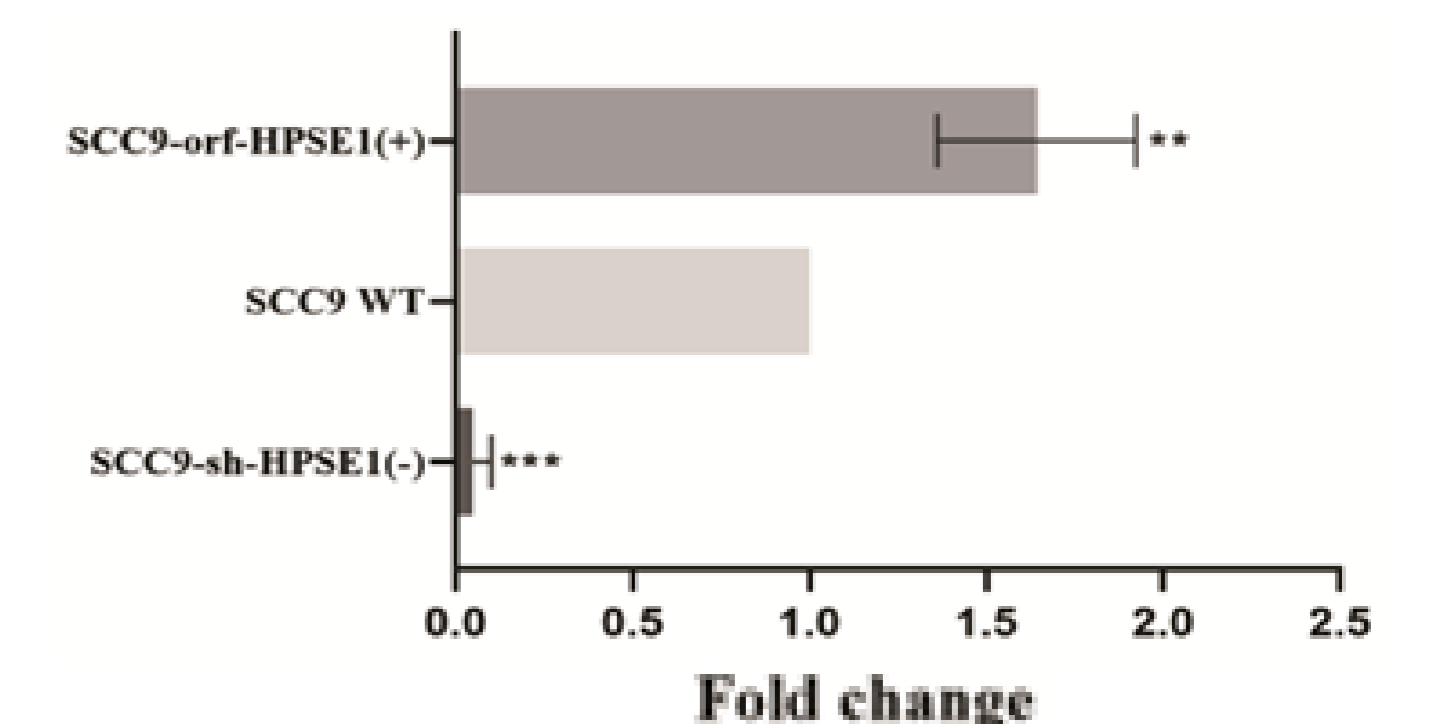


FIGURA 9 - Análise de expressão gênica do fator de crescimento endotelial VEGFA por qRT-PCR; o gráfico compila os valores de expressão em fold change relativos por ddCt obtidos pela comparação dos clones HPSE1(+) e HPSE1(-) em relação ao controle parental WT (referência normal = 1), normalizados pelo gene controle endógeno 18SR.

CONCLUSÕES

- Estes resultados sugerem a importância da HPSE1 durante o processo tumorigênese dos carcinomas orais, particularmente os processos proliferativos e angiogênicos;
- A ação da enzima heparanase parece contribuir para o processo de formação de neovasos (diretamente relacionada ao crescimento da massa tumoral e às metástases);
- A modulação da expressão dos níveis de HPSE1 induzem alterações nos genes marcadores de MEC e TEM (indicativo de seu relevante papel como marcador prognóstico para a invasão e metástase do câncer oral).