UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DIEGO MAURICIO BRAVO CALDERÓN

Migração e invasão do câncer de boca via ativação de receptor beta 2 adrenérgico por mediador do estresse

BAURU
2015

DIEGO MAURICIO BRAVO CALDERÓN

Migração e invasão do câncer de boca via ativação de receptor beta 2 adrenérgico por mediador do estresse

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientador: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira.

BAURU
2015

Bravo Calderón, Diego Mauricio
B739m Migração e invasão do câncer de boca via ativação de receptor beta 2 adrenérgico por mediador do estresse / Diego Mauricio Bravo Calderón. – Bauru, 2015.
109 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 14034013.0.0000.5417
Data: 24/04/2013

D**ADOS CURRICULARES**

Diego Mauricio Bravo Calderón

02/06/1984	Nascimento em Cuenca – Equador.
2001 – 2006	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Cuenca – Equador.
2007 – 2008	Aperfeiçoamento em Prótese Sobre Implante pelo Instituto de Ensino Odontológico, Bauru – SP.
2008 – 2008	Aperfeiçoamento em Implantodontia pelo Instituto de Ensino Odontológico, Bauru – SP.
2008 – 2008	Participação do Programa de Capacitação Profissional em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.
2007 – 2009	Curso de Especialização em Periodontia pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.
2009 – 2011	Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de Concentração: Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.
2011 – 2015	Curso de Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de Concentração: Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.

DEDICATÓRIA

El presente trabajo está dedicado para mi familia: papas hermanos, cuñados y sobrinos. Su presencia es la fuerza, esperanza y alegría que enriquecen mi vida.

AGRADECIMENTOS

A *Dios*, por ser la Fuerza que me ampara en los momentos de mayor debilidad.

A minha orientadora, *Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira.* O meu modelo a seguir como Professor, Pesquisador e Patologista. Obrigado por ter me acolhido como orientando há um pouco mais de seis anos e por ter sempre procurado as ferramentas e meios para a realização dos meus sonhos acadêmicos. Agradeço pela grande dedicação e confiança em mim depositadas, pelas oportunidades brindadas, pela infinita paciência e pelos imensuráveis ensinamentos relacionados á pesquisa, a minha maior paixão, a Patologia e a vida mesma. Além de tudo, agradeço pela amizade.

À *Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo,* por me receber muito amavelmente no Centro Internacional de Pesquisa - A.C. Camargo Cancer Center. Pela disposição e paciência para me ensinar tudo o relacionado à pesquisa básica e por sempre ter disponibilizado seu tempo para atender minhas dúvidas e questionamentos.

Ao *Prof. Dr. Fernando Augusto Soares*, chefe do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, pela oportunidade da realização desta pesquisa.

A mi *Familia,* en nombre de mis papas, *Manuel y Leonor,* por el amor incondicional, por el apoyo brindado a cada uno de mis sueños y por esperar pacientemente mi regreso a lo largo de estos años; y de mis hermanos, *Manolo y*

Maribel, por siempre haberme incentivado a perseguir mis metas, por cuidar de nuestros padres en mi ausencia y por brindarme el motivo de mi alegría, mis sobrinos.

A minha linda namorada *Mayara Caroline Silva Botelho,* por ficar do meu lado nos momentos mais difíceis do meu doutorado. Por me escutar pacientemente e me aconselhar sabiamente. Seu amor ilumina e preenche minha vida.

A meus grandes amigos estrangeiros em Bauru, *Carlos Villavicencio, Juan Fernando Ordóñez e Pablo Amoroso - "V4Team", Aldo del Carpio e Carlos Franco,* vocês se converteram em meus irmãos no Brasil, obrigado pelos bons e inesquecíveis momentos.

A *Manoel e Camila Carvalho*, pela amizade incondicional e pelos momentos felizes que compartilhamos em Bauru.

Aos professores do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, *Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira e Profa. Dra. Vanessa Soares Lara,* pelo respeito, conhecimento, e amizade entregados ao longo do curso.

Ás funcionárias do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, *Fátima Aparecida Silveira, Maria Cristina Carrara Filippi e Marina Corrêa,* por tornar a minha estadia no Departamento uma experiência lotada de alegria, carinho e respeito.

Aos Professores e Funcionários do *Departamento de Periodontia* da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, por ter aportado a meu crescimento profissional.

A meus amigos e colegas que surgiram durante o curso de Pós-graduação, *Adriana dos Santos Caetano, Ana Regina Cassaroto, Aroldo dos Santos Almeida, Bruna Maria Rodrigues Vilardi, Bruno Cavalini Cavenago, Helinton Gustavo de Lima, Karen Henriette Pinke, Mariana Rates, Natália Galvão Garcia, Priscila Lie Toubouti, Regina Barrach, Ronald Ordinola Zapata, Simone Eloiza Sita Faustino, Sylvie Brener, Taisa Maria Rodrigues Vilardi e Thais Priscila Biassi.*

Em especial para meus parceiros e parceiras, *Agnes Assao, Alexandre Simões Garcia, Francisco Abreu, José "Pepe" Burgos e Kellen Cristina Tjioe,* pelos bons momentos que ultrapassaram os limites da Faculdade.

Ao aluno da iniciação científica, *Gustavo Amaral Lauand,* pela troca de experiências e o aprendizado em conjunto.

Ao *Dr. Rafael Malagoli Rocha* do Centro Internacional de Pesquisa - A.C. Camargo Cancer Center, pela concessão da linhagem MCF-7, necessária para a realização da técnica de *Western blot.*

Ao *Dr. Martin Roffe e a aluna Luana Campos Soares* do Centro Internacional de Pesquisa - A.C. Camargo Cancer Center, pelo auxilio e a orientação durante a realização da técnica de *Western blot.*

A os amigos que surgiram durante meu período no Centro Internacional de Pesquisa - A.C. Camargo Cancer Center, *Danilo Santos, Felipe Moreira, Hildegardo Bezerra, Julio Cirullo Neto e Katia Klug,* pela boa disposição para me auxiliar ao longo da realização da minha pesquisa.

Ao *Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris* do Departamento de Saúde Coletiva da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos e pela enorme prestatividade para responder minhas dúvidas relacionadas à análise estatística.

A *Allan Barrach Guerra*, pela amizade e bom convívio durante minha permanência em São Paulo.

A *Mary Lane e Taynara Silva Botelho* pelo carinho e pela atenção.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo**, na pessoa de sua Diretora, Profa. Dra. Maria Aparecida Moreira Machado.

À **Comissão de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Presidente, Prof. Dr. Guilherme Janson.

À **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, Coordenadora da Área de Concentração em Patologia Bucal do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.

Ao **Centro Internacional de Pesquisa - A.C. Camargo Cancer Center**, na pessoa da sua Diretora, Dra. Vilma Regina Martins.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro sob a forma de bolsa de doutorado (Processo #142790/2011-7).

À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro na forma de Auxilio Regular à Pesquisa (Processo #2010/06333-3).

Muito Obrigado!

RESUMO

A ativação do receptor beta 2 adrenérgico (β2-AR), pelos mediadores químicos do estresse, pode induzir efeitos estimuladores ou inibidores na migração e invasão celular, dependendo do tipo de tumor maligno. A importância deste receptor na evolução do câncer de boca não está totalmente esclarecida. O objetivo deste estudo foi verificar a expressão do β2-AR em linhagens de carcinomas espinocelular de boca (SCC-9 e SCC-25), e investigar o papel da ativação deste receptor pela norepinefrina e de seu bloqueio por um antagonista na migração e invasão destas células neoplásicas. As células SCC-9 e SCC-25 foram investigadas quanto à expressão gênica e proteica do β2-AR, respectivamente, pelo RT-qPCR e pelo *Western blot.* A migração e a invasão celular foram analisadas pelo ensaio de cicatrização de feridas e pelo sistema de câmeras de invasão *Transwell*, respectivamente. Diferentes concentrações (0,1; 1 e 10μM) de norepinefrina foram utilizadas para estimular e 1μM de propranolol foi empregado para bloquear os receptores beta adrenérgicos nas células neoplásicas. As diferenças das médias obtidas nos experimentos de invasão e migração de SCC-9 e SCC-25 e da expressão proteica do β2-AR, foram comparadas pelo teste t de Student com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a expressão gênica e proteica do β2-AR foi verificada em ambas as linhagens de câncer de boca. A concentração de 10μM de norepinefrina inibiu, significativamente ($p \leq 0,05$), a migração e invasão celular de SCC-9 e SCC-25, sendo este efeito mais acentuado nas células SCC-25. Além disso, houve uma redução significativa ($p \leq 0,05$) do efeito da norepinefrina na migração celular quando os β2-AR foram inibidos pelo propranolol. Adicionalmente, o bloqueio dos β-ARs pelo propranolol reverteu parcialmente o efeito da norepinefrina na capacidade invasiva de SCC-9 e SCC-25. Estes resultados comprovam que a norepinefrina, via ativação do β2-AR, reduziu a migração e a invasão das células do carcinoma espinocelular de boca e, portanto, o uso de agonistas dos receptores beta-adrenérgicos poderia se tornar um alvo terapêutico adjuvante no tratamento desta neoplasia maligna.

Palavras-chave: Câncer de boca. Estresse. Receptor beta 2 adrenérgico.

ABSTRACT

Cell migration and invasion of oral cancer via activation of beta 2 adrenergic receptor by stress mediator

The activation of beta 2 adrenergic receptor (β2-AR), by chemical mediators of stress, can induce stimulatory or inhibitory effects on cell migration and invasion, depending on the type of malignancy. The importance of this receptor in the oral cancer outcome is not fully understood. The aim of this study was to verify β2-AR expression in oral squamous cell carcinoma cell lines (SCC-9 and SCC-25), and to investigate the role of activation of this receptor by norepinephrine and its blockade by an antagonist in migration and invasion of these neoplastic cells. SCC-9 and SCC-25 cells were investigated for gene and protein expression of β2-AR, respectively, by RT-qPCR and Western blot. The cell migration and invasion were analyzed by wound healing assay and Transwell invasion camera system, respectively. Different concentrations (0.1, 1 and 10μM) of norepinephrine were used to stimulate and 1μM propranolol was used to block the beta adrenergic receptors on cancer cells. Differences in mean values of the invasion and migration assays of SCC-9 and SCC-25 and β2-AR protein expression were compared by the Student t test with 5% significance level. The results showed that β2-AR gene and protein expression was verified in both oral cancer cell lines. The concentration of 10μM of norepinephrine inhibited significantly ($p \leq 0.05$), cell migration and invasion of SCC-9 and SCC-25, being the most pronounced effect in SCC-25 cells. Furthermore, there was a significant reduction ($p \leq 0.05$) of norepinephrine effect on cell migration when the β2-AR was inhibited by propranolol. In addition, blockade of β-ARs by propranolol partially reversed the effect of norepinephrine on the invasiveness of SCC-9 and SCC-25. These results show that norepinephrine via β2-AR activation, reduced the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells and, therefore, the use of beta-adrenergic receptors agonists could become an adjuvant therapeutic target in the treatment of this malignancy.

Keywords: Oral cancer. Stress. Beta 2 adrenergic receptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da ativação do β2-AR. A ativação do β2-AR resulta na dissociação citoplasmática da subunidade α da proteína G, que estimula a adenilciclase a clivar o ATP (trifosfato de adenosina) gerando o cAMP (monofosfato de adenosina cíclico). O cAMP ativa a PKA (proteína quinase A) e as EPAC (proteínas de troca ativadas pelo cAMP) que fosforilam diversos fatores de transcrição, que no caso de células neoplásicas podem estimular ou inibir as funções celulares..... 35

Figura 2 - Análise de *Western blot* da expressão proteica do β2-AR em linhagens de adenocarcinoma humano de mama (MCF-7) e de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9 e SCC-25). A: análise feita com o anticorpo primário anti-β2-AR D6H2. B: análise feita com o anticorpo primário anti-β2-AR sc-9042. C: Beta actina. kDa: kilodaltons; *: bandas consistentes com o estado monomérico do receptor; ǁ: bandas consistentes com o estado de glicosilação do receptor; ←: bandas consistentes com a dimerização do receptor..... 63

Figura 3 - Imagens representativas da resposta migratória da linhagem de carcinoma espinocelular de boca SCC-9 após 48h dos estímulos farmacológicos nos ensaios de cicatrização de feridas. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol..... 67

Figura 4 - Imagens representativas da resposta migratória da linhagem de carcinoma espinocelular de boca SCC-25 após 48h dos estímulos farmacológicos nos ensaios de cicatrização de feridas. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol..... 73

Figura 5 - Invasão celular da linhagem de carcinoma espinocelular humano de boca SCC-9. A: células controle sem tratamento, B: células estimuladas com 10μM de norepinefrina. C: células com tratamento com 1μM de propranolol prévio à aplicação de 10μM de norepinefrina..... 77

Figura 6 - Invasão celular da linhagem de carcinoma espinocelular humano de boca SCC-25. A: células controle sem tratamento, B: células estimuladas com 10μM de norepinefrina. C: células com tratamento com 1μM de propranolol prévio à aplicação de 10μM de norepinefrina..... 81

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Expressão do RNAm para o β2-AR em amostras de mucosa oral normal e em linhagens de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9 e SCC-25). A expressão gênica constitutiva relativa foi medida por RT-qPCR e normalizada para a média geométrica dos níveis dos genes TBP e B2M. As barras representam a expressão gênica relativa do β2-AR de cada amostra, o “pool” de mucosa oral normal que foi utilizado como amostra calibradora de referência..... 61

Gráfico 2 - Expressão proteica do β2-AR em linhagens de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9 e SCC-25). Densitometria das bandas obtidas para cada anticorpo primário..... 63

Gráfico 3 - Migração das células SCC-9 tratadas com diferentes concentrações de norepinefrina, de propranolol ou ambas, após 16, 24, 48 e 72h. Em A, nota-se todos os resultados obtidos e em B, detalhe das diferenças estatisticamente significativas encontradas entre as células tratadas com 10μM de norepinefrina em relação ao controle e em relação ao grupo de células que receberam 1μM de propranolol antes dos 10μM de norepinefrina. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol; *: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao controle sem tratamento; **: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao tratamento com 10μM de norepinefrina. As barras de erro representam o erro padrão das médias..... 65

Gráfico 4 - Migração das células SCC-25 tratadas com diferentes concentrações de norepinefrina, de propranolol ou ambas, após 16, 24, 48 e 72h. Em A, nota-se todos os resultados obtidos e em B, detalhe das diferenças estatisticamente significativas encontradas entre as células tratadas com 10μM de norepinefrina em relação ao controle e em relação ao grupo de células que receberam 1μM de propranolol antes dos 10μM de norepinefrina. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol; *: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao controle sem tratamento; **: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao tratamento com 10μM de norepinefrina. As barras de erro representam o erro padrão das médias..... 71

Gráfico 5 - Células SCC-9 invasoras após os tratamentos com norepinefrina, propranolol ou ambas. A quantidade de células representa a média de cinco campos microscópicos analisados por tratamento. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol; *: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao controle sem tratamento. As barras de erro representam o erro padrão das médias..... 76

Gráfico 6 - Células SCC-25 invasoras após os tratamentos com norepinefrina, propranolol ou ambas. A quantidade de células representa a média de cinco campos microscópicos analisados por tratamento. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol; *: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao controle sem tratamento. As barras de erro representam o erro padrão das médias..... 80

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

18S	Gene do RNA ribossômico 18S
ACTB	Gene da beta actina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADRB2	Gene do receptor beta 2 adrenérgico
ATP	Trifosfato de adenosina
AVP	Arginina Vasopressina
B2M	Gene da microglobulina beta 2
BSA	Soro albumina bovino
CA	Califórnia
cAMP	AMP cíclico ou monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	DNA complementar
CEC	Carcinoma espinocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CRF	Fator Liberador de Corticotrofina
C_T	Ciclo limite ou *threshold cycle*
Ctrl	Controle
Dex	Dexmedetomidina
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)
EPAC	*Exchange protein activated by cAMP* (proteínas de troca ativadas pelo cAMP)
EUA	Estados Unidos da América
F12	Nutriente F12 de Ham
GAPDH	Gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Iso	Isoproterenol

kDa	Kilodalton
MA	*Massachusetts*
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mM	Milimol
MMP-2	Metaloproteinases 2
MMP-9	Metaloproteinases 9
MMPs	Metaloproteinases
MO	*Missouri*
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Norepinefrina
NK	Células *Natural Killer*
ºC	Grau Celsius
P	Propranolol
p	Valor de teste estatístico
PBS	*Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada com fosfatos)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase A
RJ	Estado de Rio de Janeiro
RNA	*Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
RNAm	RNA mensageiro
RNase	Ribonuclease
rpm	Revoluções por minuto
Rq	Quantidade relativa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real
SCC-25	Células de carcinoma espinocelular de boca humano, linhagem 25
SCC-9	Células de carcinoma espinocelular de boca humano, linhagem 9
SFB	Soro fetal bovino
SP	Estado de São Paulo
SPSS	*Statistical Package for the Social Sciences* (Pacote Estatístico Para as Ciências Sociais)
TBP	gene da proteína de ligação TATA
TBS	*Tris-Buffered Saline* (tampão salino de tris)

UI	Unidades internacionais
UK	*United Kingdom* (Reino Unido)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
α	Alfa
α1	Alfa 1
α2	Alfa 2
α-ARs	Receptores alfa adrenérgicos
β1	Beta 1
β1-AR	Receptor beta 1 adrenérgico
β2	Beta 2
β2-AR	Receptor beta 2 adrenérgico
β3	Beta 3
β-ARs	Receptores beta adrenérgicos
µg	Microgramas
µM	Micromol

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	23
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	29
2.1	O ESTRESSE - RESPOSTA BIOLÓGICA ADAPTATIVA	31
2.2	RELAÇÃO DO ESTRESSE E O CÂNCER	32
2.2.1	**Receptor beta 2 adrenérgico e a migração e a invasão de células neoplásicas**	34
3	**PROPOSIÇÃO**	43
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	47
4.1	CULTURA DE CÉLULAS	49
4.2	TRATAMENTOS DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS COM NOREPINEFRINA E/OU PROPRANOLOL	50
4.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO β2-AR POR RT-qPCR	50
4.3.1	**Extração do RNA**	50
4.3.2	**Purificação do RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)**	51
4.3.3	**Quantificação do RNAm para o β2-AR**	52
4.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DO β2-AR POR *WESTERN BLOT*	53
4.5	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR *IN VITRO*	54
4.6	ENSAIO DE INVASÃO CELULAR *IN VITRO*	55
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4.8	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	57
5	**RESULTADOS**	59
5.1	EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPOR BETA 2 ADRENÉRGICO	61
5.2	EXPRESSÃO PROTEICA DO RECEPTOR BETA 2 ADRENÉRGICO	62
5.3	ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDA - MIGRAÇÃO CELULAR *IN VITRO*	62

5.3.1 **Resposta migratória da linhagem SCC-9** 64
5.3.2 **Resposta migratória da linhagem SCC-25** 69
5.3.3 **Comparação da resposta migratória nas linhagens SCC-9 e SCC-25** 70
5.4. ENSAIO DE INVASÃO CELULAR *IN VITRO* 75
5.4.1 **Resposta invasiva da linhagem SCC-9** 75
5.4.2 **Resposta invasiva da linhagem SCC-25** 79
5.4.3 **Comparação da resposta invasiva nas linhagens SCC-9 e SCC-25** 79

6 **DISCUSSÃO** 83

7 **CONCLUSÕES** 93

REFERÊNCIAS 97

ANEXO 105

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A migração e a invasão das células neoplásicas são pré-requisitos essenciais para o desenvolvimento das metástases tumorais em órgãos distantes (THAKER; SOOD, 2008; BRAADLAND et al., 2014). Embora pesquisas tenham estabelecido algumas das moléculas específicas capazes de regular as diferentes etapas das metástases, existem ainda, alguns fatores e questionamentos sobre a natureza deste processo que não foram totalmente esclarecidos (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

Nos últimos anos, pesquisas epidemiológicas demostraram que o estresse psicossocial pode estar correlacionado com a progressão de tumores malignos, e que o uso de fármacos antagonistas dos receptores beta adrenérgicos (β-ARs), comumente prescritos para o tratamento da hipertensão, esta associado à redução do desenvolvimento de metástases e ao incremento das probabilidades de sobrevida dos pacientes com câncer (LILLBERG et al., 2003; METCALFE et al., 2007; POWE et al., 2010; CHOI et al., 2014).

Além das análises epidemiológicas, estudos *in vitro* com diferentes linhagens celulares neoplásicas bem como modelos animais têm sido utilizados para esclarecer os mecanismos da relação do estresse com a progressão do câncer (MASUR et al., 2001; THAKER et al., 2006; YANG et al., 2006; YU et al., 2007; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009; ZHANG et al., 2009; PARK et al., 2011; MORETTI et al., 2013; WNOROWSKI et al., 2015). Assim sendo, está bem estabelecido que os efeitos biológicos dos neurotransmissores do estresse, norepinefrina e epinefrina, são mediados principalmente pelo receptor beta 2 adrenérgico (β2-AR), que pode ser encontrado em diferentes células neoplásicas (MASUR et al., 2001; THAKER et al., 2006; YU et al., 2007; BRAVO-CALDERÓN et al., 2011; COLE; SOOD, 2012; MORETTI et al., 2013).

A ligação dos neurotransmissores ao β2-AR, localizado na membrana das células neoplásicas, resulta na ativação de uma cascada de sinalização intracelular envolvendo proteínas e fatores de transcrição que vem sendo associados a evolução dos tumores malignos (COLE; SOOD, 2012; BRUZZONE et al., 2014).

Algumas investigações *in vitro* mostraram que linhagens celulares neoplásicas estimuladas com norepinefrina exibiram aumento na produção de fatores angiogênicos reforçando que a ativação dos β-ARs, incluindo o β2-AR pelos mediadores do estresse, induz a formação de novos vasos sanguíneos (YANG et al., 2006; YANG et al., 2009; PARK et al., 2011). Também, em modelo i*n vivo* foi verificado um aumento da densidade vascular em carcinoma de ovário desenvolvido em animais submetidos ao estresse (THAKER et al., 2006).

Por outro lado, o estudo das atividades antineoplásicas dos bloqueadores beta adrenérgicos demostrou que as células neoplásicas de pâncreas submetidas ao tratamento com antagonistas farmacológicos do β2-AR apresentaram inibição da proliferação celular induzida pela apoptose (ZHANG et al., 2009).

Com relação a migração e a invasão de células neoplásicas, a literatura cientifica reporta achados heterogêneos, já que a ativação do β2-AR pode induzir efeitos estimuladores ou inibidores, dependendo do tipo de tumor maligno (MASUR et al., 2001; YANG et al., 2006; YU et al., 2007; SHANG; LIU; LIANG, 2009; MORETTI et al., 2013; WNOROWSKI et al., 2015).

Interessantemente, Yu et al. (2007) demonstraram que a ativação do β2-AR, em linhagens celulares de câncer de próstata reduziu, significativamente, a capacidade invasiva destas células. Além disso, verificaram que tumores de próstata metastáticos apresentaram os níveis mais fracos de expressão do β2-AR quando comparadas a lesões primárias, e que, baixos níveis de expressão do β2-AR em carcinomas localizados de próstata estavam associados a recidiva tumoral. O modelo de regressão de Cox identificou o β2-AR como um fator independente de prognóstico para o câncer de próstata. Os autores sugeriram que o β2-AR poderia ser utilizado como um biomarcador de prognóstico do câncer de próstata.

Especificamente no carcinoma espinocelular (CEC) de boca, o papel do β2-AR permanece controvertido. Experimentos realizados em linhagens celulares de CEC de boca associaram o estímulo do β2-AR pela norepinefrina a progressão tumoral devido ao incremento da proliferação celular, da produção de interleucina 6 e da quimioatração das células malignas em direção da catecolamina (SHANG; LIU; LIANG, 2009; BERNABÉ et al., 2011). Todavia, em um estudo recente onde investigamos o significado clínico da imunoexpressão do β2-AR em CEC de boca na

evolução tumoral, verificamos que a forte expressão deste receptor pelas células malignas se mostrou um fator de prognóstico favorável para os pacientes com câncer de boca (BRAVO-CALDERÓN et al., 2011).

Embora estudos, como os descritos acima, mostraram que as células do carcinoma espinocelular de boca expressam receptores adrenérgicos, não foram encontrados, na literatura científica, investigações sobre a influência do estímulo direto do β2-AR, por mediadores do estresse, nos processos de migração e de invasão celular do câncer de boca. Assim sendo, o presente estudo foi delineado visando conhecer a participação do mediador do estresse, via ativação do β2-AR, na migração e na invasão das células malignas e sua relevância no câncer de boca.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ESTRESSE - RESPOSTA BIOLÓGICA ADAPTATIVA

O estresse é definido como o complexo repertório de respostas adaptativas fisiológicas e comportamentais do organismo frente a agentes conhecidos como estressores (CHROUSOS, 1998; SZABO; TACHE; SOMOGYI, 2012). Os estressores se caracterizam por ameaçar o equilíbrio dinâmico ou homeostase do organismo, e por serem de natureza diversa, uma vez que podem incluir estímulos físicos, químicos, biológicos ou psicológicos (SZABO; TACHE; SOMOGYI, 2012; NICOLAIDES et al., 2015).

O fenómeno do estresse atua através da ação coordenada do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e do sistema nervoso autônomo, e tem inicio quando os sistemas captam e integram os sinais produzidos em consequência da ação dos agentes estressores (CHROUSOS, 1998; ANTONI et al., 2006; NICOLAIDES et al., 2015).

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) representa a resposta neuroendócrina aos fenómenos estressores e é constituído por três regiões anatómicas: o hipotálamo, a glândula pituitária e o córtex das glândulas supra-renais (NICOLAIDES et al., 2015). A atividade do eixo HPA é governada pela secreção dos hormônios Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) e Arginina Vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, os que, por sua vez, estimulam à glândula pituitária (ou hipófise) a liberar a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que finalmente induz a formação e secreção de glicocorticoides, como o cortisol, pelo córtex das glândulas supra-renais (ANTONI et al., 2006; NICOLAIDES et al., 2015).

Adicionalmente, existe a resposta do sistema nervoso autônomo, a qual é importante por estimular rapidamente ao organismo para a reação "luta ou fuga" por meio da ativação do eixo simpático-adrenal e a decorrente liberação de

catecolaminas, principalmente norepinefrina e epinefrina, pelos neurônios simpáticos e pela medula adrenal (ANTONI et al., 2006; NICOLAIDES et al., 2015).

A inervação simpática é derivada de dois tipos de neurônios, os neurônios pré-ganglionares que terminam no gânglio próximo da medula espinhal e as fibras nervosas pós-ganglionares que partem até os principais órgãos e sistemas efetores periféricos (CHROUSOS, 1998; ANTONI et al., 2006). Assim sendo, o principal neurotransmissor das fibras simpáticas pré-ganglionares é a acetilcolina e o neurotransmissor típico liberado pelos neurônios pós-ganglionares é a norepinefrina (também conhecida como noradrenalina) (CHROUSOS, 1998; ANTONI et al., 2006). A ativação do sistema nervoso simpático, por meio da modulação da medula adrenal, é também responsável pelo aumento das catecolaminas no sangue, principalmente a epinefrina (também conhecida como adrenalina) e parte da norepinefrina circulantes (CHROUSOS, 1998; COLE; SOOD, 2012).

Os dois mecanismos acima descritos são considerados adaptativos e de tempo limitado, tendo como finalidade preparar o indivíduo para enfrentar e sobreviver a uma ameaça. Porém, em situações de estresse crônico, a atividade de órgãos e sistemas (cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, renal, endócrino, e outros) é alterada, sendo este efeito mediado pela prolongada ação dos mediadores químicos do estresse: cortisol e catecolaminas (CHROUSOS, 1998; NICOLAIDES et al., 2015).

2.2 RELAÇÃO DO ESTRESSE E O CÂNCER

No decorrer dos últimos anos surgiram evidencias científicas indicando que os mediadores químicos do estresse crônico podem modular importantes aspectos da iniciação e progressão dos tumores malignos (UOTILA, 1996; KALINICHENKO et al., 1999; DISTELHORST, 2002; HASEGAWA; SAIKI, 2002; LILLBERG et al., 2003; SAUL et al., 2005; ANTONI et al., 2006; SOOD et al., 2006; THAKER et al., 2006; YANG et al., 2006; METCALFE et al., 2007; GIDRON; RONSON, 2008; SEPHTON et al., 2009; YANG et al., 2009; BERNABÉ et al., 2011; PARK et al., 2011; MORETTI et al., 2013).

Assim sendo, estudos verificaram que o cortisol e as catecolaminas atuam como imunossupressores induzindo, principalmente a atrofia do timo, a apoptose de linfócitos, a redução da produção de citocinas e ainda, a diminuição da capacidade de eliminar células tumorais por parte dos linfócitos T e das células *Natural Killer* (NK) (UOTILA, 1996; KALINICHENKO et al., 1999; DISTELHORST, 2002; HASEGAWA; SAIKI, 2002; SAUL et al., 2005; GIDRON; RONSON, 2008; SEPHTON et al., 2009).

Foi observado também, que o estímulo de receptores adrenérgicos, pela a norepinefrina e/ou a epinefrina, regula diretamente as funções das células neoplásicas (ANTONI et al., 2006; THAKER et al., 2006; LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b; YANG et al., 2009; BERNABÉ et al., 2011; PARK et al., 2011; TOLL et al., 2011; PEREZ PIÑERO et al., 2012; GARGIULO et al., 2014; WNOROWSKI et al., 2015). Estes receptores são proteínas membranosas classificadas, em função da sua afinidade por diferentes agonistas farmacológicos, em cinco diferentes subtipos: os receptores adrenérgicos alfa 1 (α1) , alfa 2 (α2), beta 1 (β1), beta 2 (β2) e beta 3 (β3) (WALLUKAT, 2002; COLE; SOOD, 2012).

Dentre os receptores adrenérgicos, o β2-AR destaca-se pela ampla distribuição no organismo e tem sido inclusive encontrado em diferentes células neoplásicas, onde é indicado como o principal subtipo de receptor envolvido na mediação dos efeitos das catecolaminas no câncer (MASUR et al., 2001; THAKER et al., 2006; LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b; SHANG; LIU; LIANG, 2009; SIVAMANI et al., 2009; YANG et al., 2009; BERNABÉ et al., 2011; BRAVO-CALDERÓN et al., 2011; MADDEN; SZPUNAR; BROWN, 2011; PARK et al., 2011; STEENHUIS et al., 2011; TOLL et al., 2011; COLE; SOOD, 2012; PEREZ PIÑERO et al., 2012; GARGIULO et al., 2014; WANG et al., 2015; WNOROWSKI et al., 2015).

O β2-AR é um membro da família de receptores associados à proteína G heterotrimérica; a ligação da norepinefrina ou epinefrina ao receptor resulta na dissociação da subunidade α da proteína G que, por sua vez, provoca a ativação da adenilciclase e a subsequente conversão do ATP em AMP cíclico (cAMP) (DAAKA; LUTTRELL; LEFKOWITZ, 1997; COLE; SOOD, 2012). O segundo mensageiro cAMP coordena os efeitos da sinalização do β2-AR através de duas vias, a clássica pela ativação da proteína quinase A (PKA) e uma paralela pelo estímulo das

proteínas de troca ativadas pelo cAMP (*exchange protein activated by cAMP* - EPAC) (COLE; SOOD, 2012). Finalmente, ambas as moléculas (PKA e EPAC), quando ativadas, fosforilam proteínas e fatores de transcrição envolvidos em diversos processos celulares, incluindo a proliferação, a diferenciação, a apoptose, a angiogênese, a adesão, a migração, as metástases, e a produção de citocinas e fatores de crescimento (COLE; SOOD, 2012; BRUZZONE et al., 2014). A Figura 1 ilustra as principais vias de sinalização celular após a ativação do β2-AR.

Em relação ao câncer, a sinalização do β2-AR tem se mostrado heterogênea, pois, foi observado que pode estimular ou inibir as funções das células neoplásicas malignas (MADDEN; SZPUNAR; BROWN, 2011). Assim sendo, enquanto alguns autores observaram que o estímulo das catecolaminas produz um aumento na proliferação de linhagens de carcinoma espinocelular de esôfago (LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b) e de boca (SHANG; LIU; LIANG, 2009; BERNABÉ et al., 2011), outros, demonstraram que a replicação de células malignas de carcinoma de mama (CARIE; SEBTI, 2007; PEREZ PIÑERO et al., 2012) e de astrocitomas (TOLL et al., 2011) é reduzida pela ação de agonistas farmacológicos dos β2-AR.

2.2.1 Receptor Beta 2 Adrenérgico e a Migração e a Invasão de Células Neoplásicas

As investigações sobre os efeitos da ativação do β2-AR na migração e na invasão das células neoplásicas demostraram resultados discrepantes dependendo do tipo de câncer, da linhagem celular empregada e da via de sinalização molecular analisada (MASUR et al., 2001; SOOD et al., 2006; YANG et al., 2006; YU et al., 2007; SHANG; LIU; LIANG, 2009; MORETTI et al., 2013; GARGIULO et al., 2014; WANG et al., 2015; WNOROWSKI et al., 2015).

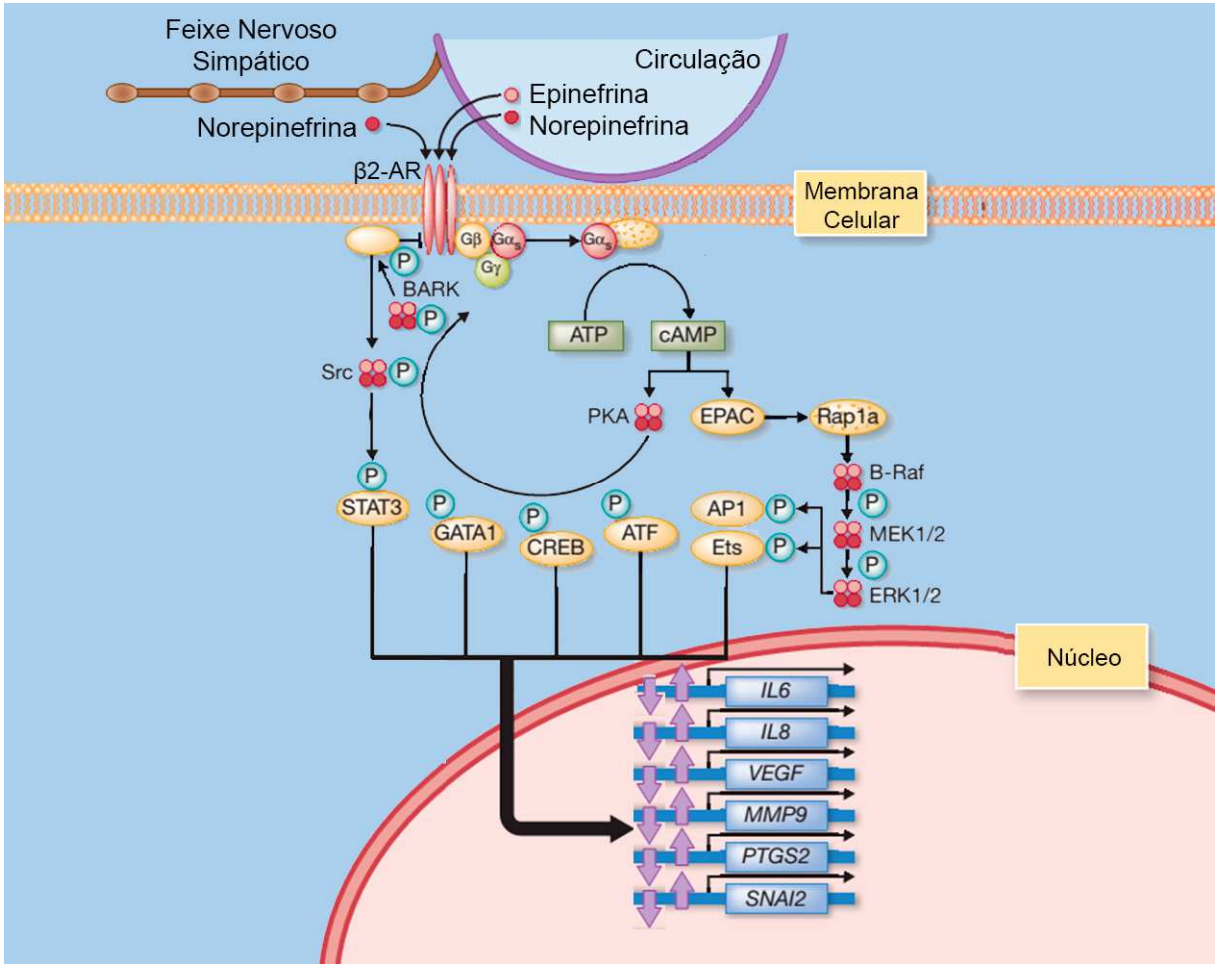


Figura 1 - Representação esquemática da ativação do β2-AR. A ativação do β2-AR resulta na dissociação citoplasmática da subunidade α da proteína G, que estimula a adenilciclase a clivar o ATP (trifosfato de adenosina) gerando o cAMP (monofosfato de adenosina cíclico). O cAMP ativa a PKA (proteína quinase A) e as EPAC (proteínas de troca ativadas pelo cAMP) que fosforilam diversos fatores de transcrição, que no caso de células neoplásicas podem estimular ou inibir as funções celulares. Adaptado de Cole e Sood (2012).

Em 2001, Masur et al. (2001) investigaram se as catecolaminas eram capazes de regular a migração de linhagens celulares de carcinoma de cólon. A expressão dos receptores adrenérgicos foi analisada por citometria de fluxo, e para determinar a locomoção celular, foi usada a técnica da videomicroscopia. Os β-ARs foram altamente expressos nas células malignas. O tratamento com norepinefrina aumentou a atividade de locomoção das células malignas em 65%. O propranolol, bloqueador inespecífico dos β-ARs atenuou este aumento. Em contraste, o bloqueador específico do β1-AR, atenolol, não alterou os efeitos da norepinefrina. Os autores concluíram que a norepinefrina estimulou a migração das células do carcinoma de cólon, via estímulo do β2-AR, e sugeriram que os bloqueadores deste receptor poderiam ser úteis na prevenção da invasão e metástases destas células neoplásicas.

Posteriormente, Sood et al. (2006) correlacionaram os efeitos dos hormônios do estresse, norepinefrina e epinefrina, com o potencial invasivo de células de câncer de ovário. O estimulo com norepinefrina ou com epinefrina incrementaram significativamente a atividade invasiva das células de câncer de ovário, sendo que o propranolol bloqueou completamente os efeitos induzidos por estas catecolaminas, indicando assim o envolvimento dos β-ARs. Os níveis das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2, MMP-9) em resposta do tratamento com norepinefrina foram também analisados. A norepinefrina aumentou a expressão de MMP-2 e MMP-9 pelas células neoplásicas. Adicionalmente, o bloqueio farmacológico das metaloproteinases (MMPs) inibiram os efeitos da norepinefrina na invasão celular. Com base nestes achados, os autores concluíram que os hormônios do estresse, por meio da regulação da MMP-2 e da MMP-9 via ativação dos β-ARs, podem diretamente incrementar o potencial invasivo das células de câncer de ovário.

Ainda em 2006, Yang et al. (2006) verificaram se o hormônio norepinefrina poderia influenciar a progressão do carcinoma nasofaríngeo por meio da modulação das capacidades invasiva e angiogênica das células neoplásicas. A expressão gênica e proteica dos β-ARs nas linhagens celulares neoplásicas foram, respectivamente, analisadas pela reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR) e pelo *Western blot*. Os efeitos da

norepinefrina sobre a expressão da MMP-2, da MMP-9 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foram determinados por ELISA. Em sequência, a atividade funcional das células foi avaliada pelo potencial de invasão celular usando um sistema de invasão de membrana em cultura e pelo ensaio de formação de tubo por células endoteliais de veia umbilical humana. O RT-PCR demostrou que as células malignas analisadas expressavam constitutivamente o RNA mensageiro (RNAm) para o β1-AR e para o β2-AR e a análise de *western* blot confirmou a expressão proteica de ambos os receptores beta adrenérgicos. O tratamento com norepinefrina aumentou os níveis de MMP-2, MMP-9 e VEGF no sobrenadante da cultura de carcinoma nasofaríngeo, sendo este efeito bloqueado pelo propranolol. Observou-se também, que o hormônio norepinefrina induziu a uma maior atividade angiogênica e a um incremento dose dependente da capacidade invasiva das células malignas, sendo estes efeitos também inibidos pelo propranolol. Os autores, com base nestes resultados, sugeriram que o hormônio norepinefrina, via ativação dos β-ARs, afetou a progressão do carcinoma nasofaríngeo, em parte, por meio da modulação das citocinas angiogênicas.

Por outro lado, Yu et al. (2007) analisaram o papel da expressão diminuída do β2-AR em células normais de próstata. Verificaram que as células normais de próstata com silenciamento gênico do β2-AR ou com o bloqueio farmacológico deste receptor, apresentaram um incremento das capacidades migratória e invasiva. Estes resultados sugeriram que, a inibição do β2-AR induziu um fenótipo oncogênico nas células benignas de próstata. Adicionalmente, quando aplicado o agonista adrenérgico isoproterenol nas células normais de próstata com expressão reduzida do β2-AR, bem como em linhagens celulares de câncer de próstata, foi detectada uma redução significativa da capacidade invasiva. Além disso, os autores avaliaram a expressão imuno-histoquímica do β2-AR em 36 amostras de tecido prostático normal, 6 de neoplasia intra-epitelial de próstata, 82 de carcinoma de próstata localizado e 16 de carcinomas de próstata metastáticos. Houve diferenças estatisticamente significativas na expressão imuno-histoquímica do receptor, sendo que os tumores metastáticos tiveram os níveis mais fracos de expressão do β2-AR. Analisaram ainda, a sobrevida livre de doença dos 82 pacientes com carcinomas localizados de próstata, pelo método de Kaplan-Meier, e os resultados revelaram que os escores baixos de expressão do β2-AR foram

associados significativamente com a recidiva tumoral, quando comparados aos altos escores de expressão desta proteína. Adicionalmente, o modelo de regressão de Cox indicou o β2-AR como um fator independente de prognóstico para o câncer de próstata. A probabilidade de recidiva tumoral em pacientes com leve expressão do β2-AR nas células malignas foi 3,4 vezes superior, se comparado àqueles com forte expressão desta proteína. Os autores sugeriram então, que o β2-AR poderia ser utilizado como um biomarcador de prognóstico do câncer de próstata.

Mais recentemente, duas pesquisas independentes realizadas em diferentes linhagens de melanoma humano revelaram resultados divergentes quanto à resposta invasiva mediada pelo estímulo do β2-AR (MORETTI et al., 2013; WNOROWSKI et al., 2015). Moretti et al. (2013), estudaram os efeitos da norepinefrina e da epinefrina no comportamento de células de melanoma humano. As análises de RT-qPCR e *Western blot* demostraram que, as linhagens A375 (melanoma primário) e Hs294T (melanoma metastático) expressaram baixos níveis do β1-AR, enquanto que apresentaram altos níveis do β2-AR. A expressão do β2-AR foi significativamente superior na linhagem primária A375 do que na linhagem metastática Hs294T. Ensaios de invasão de membranas revelaram que ambas as catecolaminas, norepinefrina e epinefrina, estimularam a função invasiva das duas linhagens de melanoma, sendo que o efeito foi maior nas células A375 do que nas células Hs294T. Os efeitos pro-invasivos das catecolaminas foram bloqueados pelo propranolol e por inibidores das MMPs, confirmando assim o envolvimento dos β-ARs, principalmente do β2-AR, e das MMPs na invasão celular. Adicionalmente, o estimulo com norepinefrina e epinefrina causou o incremento da produção da MMP-2, VEGF, interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8). Os autores sugeriram então, que as catecolaminas, via ativação dos β-ARs, modulam a agressividade das células de melanoma humano.

Contrariamente, Wnorowski et al. (2015) verificaram que o estimulo do β2-AR, com agonista farmacológico específico, reduziu consideravelmente a migração e invasão das linhagens metastáticas de melanoma humano: UACC-647, M93-047 e UACC-903. A presença do β2-AR foi confirmada nas três linhagens de melanoma, entretanto foram verificados diferentes níveis de expressão entre as células neoplásicas. As respostas ao estímulo com o agonista farmacológico foram

correlacionadas positiva e significativamente com os níveis de expressão do β2-AR, sendo que as células que apresentaram uma maior expressão do β2-AR também exibiram uma maior inibição da migração e da invasão celular. Adicionalmente, foi observado que o bloqueio farmacológico específico do β2-AR suprimiu completamente os efeitos anti-migratórios do agonista. Foi demostrado ademais, que a produção de cAMP e a ativação da PKA mediam a atividade anti-migratória do agonista β2-AR. Com base nestes achados, os autores identificaram o β2-AR como um novo alvo para o tratamento do melanoma. Recomendaram também que para obter melhores resultados clínicos é necessária a análise do perfil da expressão tumoral do β2-AR em cada paciente.

Em um interessante trabalho, Gargiulo et al. (2014) estudaram a importância da expressão do β2-AR na adesão e migração de células de mama humana neoplásicas (MCF-7 e MDA-MB-231) e não neoplásicas (MCF-10A e HBL-100). Nas células MCF-10A e HBL-100, a epinefrina e o agonista beta adrenérgico inespecífico isoproterenol (Iso) incrementaram marcadamente o número de células aderidas às placas de cultura, bem como inibiram a migração celular. O tratamento destas células não neoplásicas com o agonista alfa adrenérgico dexmedetomidina (Dex) não resultou em nenhum efeito na adesão ou migração celular, sugerindo assim que os efeitos da epinefrina nestas células foram induzidos pelos β-ARs. Quanto às linhagens neoplásicas, nas células MCF-7 foi observado que a ativação dos β2-AR, pelo tratamento com Iso, causou um significante aumento da adesão celular com a coincidente inibição da migração celular, entretanto, a norepinefrina e o Dex aumentaram significativamente a migração celular, indicando assim o envolvimento, nestas células, dos receptores alfa adrenérgicos (α-ARs) na ação da norepinefrina. Por outro lado, nas células MDA-MB-231 a epinefrina não provocou nenhuma diferença, já os efeitos do Iso e do Dax foram opostos, sendo que o Dax diminuiu a adesão e incrementou a migração celular.

Na tentativa de explicar os resultados previamente descritos, onde a epinefrina produz efeitos diferentes em células neoplásicas e não neoplásicas de mama, os níveis do β2-AR e do seu segundo mensageiro, o cAMP, foram analisados nas linhagens MCF-10A e MCF-7 (GARGIULO et al., 2014). A expressão do β2-AR foi maior na linhagem MCF-10 do que na linhagem MCF-7 e o estimulo com

epinefrina aumentou os níveis de cAMP somente nas células MCF-10A. Assim sendo, foi sugerido que a ausência de aumento do cAMP nas células MCF-7 foi devida aos baixos níveis de β2-AR nestas células e à atividade da catecolamina por meio dos α-ARs (GARGIULO et al., 2014).

Posteriormente, os níveis de β2-AR foram modificados em ambas as células de mama, e a adesão e a invasão celular em resposta do estimulo do receptor com epinefrina foram mais uma vez avaliados (GARGIULO et al., 2014). Em ambas as linhagens, MCF-10A e MCF-7, o silenciamento do β2-AR causou a diminuição da adesão celular e o incremento da migração celular, enquanto que foi observado um efeito totalmente oposto quando realizado o aumento da expressão do β2-AR. Com base nestes resultados os autores concluíram que a ativação, mas principalmente os níveis de expressão do β2-AR estão implicados no fenótipo das células neoplásicas da mama, modulando a adesão e migração destas células. Sugeriram ainda, que o uso de agonistas ou antagonistas do β2-AR pode vir a complementar futuramente o tratamento do câncer.

Adicionalmente, Wang et al. (2015) investigaram se os receptores de quimiocinas estão envolvidos nos efeitos da norepinefrina no câncer de mama. Foi observado em uma linhagem de câncer de mama que a norepinefrina diminuiu a expressão gênica e proteica do receptor de quimiocinas CXCR4. A diminuição do CXCR4 foi acompanhada pela redução da invasão celular em direção do agonista CXCL12. Além disso, o tratamento prévio com o antagonista específico do β2-AR eliminou o efeito da norepinefrina sobre a expressão do CXCR4. Assim sendo, os autores concluíram que a norepinefrina atenuou a expressão do CXCR4 e a correspondente invasão das células de câncer de mama via ativação do β2-AR.

Particularmente na mucosa oral, Steenhuis et al. (2011) verificaram, por meio de estudos de *microarray* e *Western blot,* que o β2-AR é o principal tipo de receptor adrenérgico expresso em queratinócitos humanos normais de boca. Comprovaram ainda, que a ativação do β2-AR pela epinefrina diminuiu a velocidade da migração e as porcentagens de fechamento das fendas experimentalmente provocadas nas monocamadas de cultura destas células. Para os autores, estas observações demostraram que os aumentos das catecolaminas induzidas pelo estresse podem alterar a migração dos queratinócitos orais.

Com relação ao no carcinoma espinocelular (CEC) de boca, Shang, Liu e Liang (2009) examinaram a correlação entre o β2-AR e a metástase. Foram empregados RT-PCR e *Western blot* para determinaram os níveis de expressão do β2-AR na linhagem TCa8113, estabelecida de um paciente com carcinoma espinocelular de língua, e na linhagem ACC, de adenocarcinoma salivar que foi utilizada como controle. Após o emprego de norepinefrina foi analisada a quimiotaxia das células neoplásicas em direção do neurotransmissor. A técnica imuno-histoquímica foi utilizada para investigar a expressão do β2-AR em 65 carcinomas espinocelulares de boca obtidos de pacientes sem tratamento prévio (28 pacientes com estadio clínico I/II, 37 com estadio III/IV) e destes, 31 apresentavam metástase linfonodal. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti- receptor beta 2 adrenérgico, sendo considerados positivos os carcinomas com mais de 30% de células malignas imunomarcadas para o receptor. Os resultados demonstraram que as células de câncer de boca e de adenocarcinoma salivar cultivadas *in vitro* expressaram o RNAm para o β2-AR, porém, a expressão proteica deste receptor foi detectada somente na linhagem TCa8113. As células de câncer de boca atravessaram barreiras membranosas em direção da norepinefrina em uma maneira dose dependente. Entretanto, não houve diferenças significativas do número de células invasoras entre as células TCa8113 com expressão do β2-AR e as células ACC sem expressão do β2-AR. Finalmente, a avaliação imuno-histoquímica evidenciou que as células tumorais tiveram marcação citoplasmática e membranosa positiva para o β2-AR. Um total de 67,7% dos carcinomas espinocelulares de boca foi positivo para a expressão de β2-AR, sendo esta imunomarcação significativamente correlacionada com a metástase linfonodal, a idade, o tamanho e o estadio clínico do tumor. Estes resultados permitiram concluir que a expressão positiva do β2-AR pode mediar o desenvolvimento da metástase do carcinoma espinocelular de boca.

Entretanto, nosso grupo de pesquisa numa avaliação retrospectiva de 106 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para CEC de boca primário, observou que a expressão do β2-AR tem um significado clínico diferente ao do trabalho anteriormente descrito (SHANG; LIU; LIANG, 2009). A expressão imuno-histoquímica do β2-AR foi detectada na membrana e no citoplasma das células malignas da maioria dos CECs de boca (72,6%) analisados e foi, significativamente,

associada ao etilismo (p=0,021), tabagismo e etilismo simultâneo (p=0,014) e estadiamento T (p=0,07). A análise de sobrevida revelou que os pacientes cujos tumores demonstraram expressão imuno-histoquímica forte do β2-AR apresentaram maiores taxas de sobrevida global (p=0,001) e específica por câncer (p=0,004), quando comparadas aquelas dos pacientes com tumores com imunoexpressão fraca ou ausente desta proteína. Detectou-se ainda, que a expressão do β2-AR foi um fator prognóstico favorável independente quando comparado a outras variáveis como a idade, estadiamento N (sobrevida global, p=0,000) e o estadiamento T (sobrevida especifica por câncer, p=0,015). Com base nestes resultados foi sugerido que a forte expressão do β2-AR nas células malignas constitui um fator prognóstico favorável em pacientes com CEC de boca e que esta molécula pode ser usada como alvo de novas estratégias farmacológicas anti-neoplásicas (BRAVO-CALDERÓN et al., 2011).

A presente revisão de literatura ilustra a importância dos mediadores do estresse, e a consequente ativação do β2-AR, na migração e na invasão de células neoplásicas, incluindo as de câncer de boca, e confirma que outras investigações são necessárias para se conhecer o exato papel da ativação destes receptores no desenvolvimento e evolução tumoral.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A partir da análise de linhagens de células de carcinomas espinocelulares de boca, propôs-se:

a) confirmar e comparar a expressão gênica e proteica do receptor beta 2 adrenérgico (β2-AR) nas células neoplásicas;

b) verificar a migração e a invasão celular após o estímulo do β2-AR com diferentes concentrações de norepinefrina;

c) verificar o efeito de um antagonista do β2-AR, previamente ao estímulo com norepinefrina, na migração e invasão celular;

Contribuir com o conhecimento da participação do mediador do estresse, via ativação do receptor beta 2 adrenérgico, nos mecanismos de migração e de invasão celular do câncer de boca.

4 Material e Métodos

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Duas linhagens de carcinomas espinocelulares de boca, SCC-9 e SCC-25, obtidas de tumores de língua (SCC-9: homem de 25 anos e SCC-25: homem de 70 anos) e adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro – Associação Técnico Científica Paul Ehrlich, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, foram utilizadas neste estudo.

Adicionalmente, uma linhagem MCF-7 de adenocarcinoma humano de mama, gentilmente cedidas pelo Doutor Rafael Malagoli Rocha do A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brasil, foi empregada para auxiliar como controle nas análises de *Western blot.*

As três linhagens celulares foram mantidas e expandidas numa mistura 1:1 do meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e do nutriente F12 de Ham (DMEM/F12), tamponada com 15mM HEPES (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) e suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB), 20UI/mL de penicilina e 20µg/mL de estreptomicina, sendo todos os reagentes obtidos da Cultilab Materiais Para Cultura de Células Ltda, Campinas, SP, Brasil. As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 e foram mensalmente testadas para verificação da contaminação por espécies de *Mycoplasma* spp.

4.2 TRATAMENTOS DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS COM NOREPINEFRINA E/OU PROPRANOLOL

Para a realização dos ensaios celulares funcionais com o estimulo com norepinefrina e/ou propranolol, as células neoplásicas foram expandidas até atingir aproximadamente 80% de confluência e, então, foi reduzido a concentração de soro fetal bovino, sendo mantidas em meio de cultura DMEM/F12 com 0,1% de SFB por 24 horas.

Em seguida, as células neoplásicas foram estimuladas com concentrações de 0,1; 1 e 10μM de norepinefrina (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou com 1μM de propranolol (Calbiochemical Co, La Jolla, CA, EUA), um antagonista inespecífico dos receptores adrenérgicos. O propranolol foi utilizado isoladamente ou uma hora antes da adição dos 10μM de norepinefrina nas diferentes linhagens celulares.

Estas concentrações de norepinefrina foram determinadas com base nos níveis circulatórios desta catecolamina registrados durante o estresse (SOOD et al., 2006) e nas respostas previamente obtidas nas células SCC-9 e SCC-25 (BERNABÉ et al., 2011; VILARDI et al., 2013).

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO β2-AR POR RT-qPCR

A expressão gênica do β2-AR foi verificada nas linhagens SCC-9 e SCC-25 utilizando-se a reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR) como descrito a seguir.

4.3.1 Extração do RNA

A extração do RNA total de cada cultura celular (SCC-9 e SCC-25) foi realizada com o emprego do reagente TRIzol seguindo-se o protocolo do fabricante

(Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Rapidamente, após a remoção do meio de cultura, foram colocados 8mL do reagente TRIzol nas garrafas de cultura de 75cm^{2}, contendo as células SCC-9 ou SCC-25 com 80% da confluência. As amostras celulares foram homogeneizadas e coletadas, e a separação do material nuclear e proteico foi realizada pela adição de 1,6mL de clorofórmio. Na sequência, as amostras celulares foram incubadas à temperatura ambiente por 3 minutos, seguida da centrifugação a 10.000rpm por 15 minutos a 4°C. As fases aquosas superiores, contendo o RNA, foram delicadamente removidas e transferidas para tubos novos. Então, foi realizada a precipitação do RNA pela adição de 4mL de isopropanol acompanhada sequencialmente da agitação por inversão dos tubos, da incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e da posterior centrifugação a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado com 8mL de etanol 75% e centrifugado a 8.000rpm por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e o RNA total foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água ultrapura livre de ribonuclease (RNase) e desoxirribonuclease (DNase) por incubação a 55°C por 15 minutos. Finalmente, as amostras de RNA total obtidas foram analisadas, quanto a sua quantidade e qualidade, por meio de espectrofotometria, e imediatamente congeladas a -80°C para posterior purificação do RNA e síntese do DNA complementar.

4.3.2 Purificação do RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)

Três microgramas do RNA total de cada amostra foram submetidas ao tratamento com a enzima desoxirribonuclease usando o kit DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) por 15 minutos à temperatura ambiente, para assim eliminar possíveis contaminações com DNA. Na sequência, a atividade da DNase foi neutralizada pela adição de 2mM de EDTA pH 8,0 e aquecimento das amostras a 65°C por 10 minutos.

Uma vez purificado o RNA, realizou-se a síntese do cDNA usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription com inibidor de RNase, na presença de 1µg do RNA total purificado e nas condições de termociclagem indicadas pelo fabricante (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida,

o cDNA das diferentes amostras de células neoplásicas (SCC-9 e SCC-25) foi mantido em congelação a -20°C até a posterior amplificação e quantificação do RNA mensageiro (RNAm).

4.3.3 Quantificação do RNAm para o β2-AR

Os níveis do RNAm para o β2-AR foram determinados pelo sistema TaqMan (código # Hs00240532_s1) e amplificados no aparelho de PCR em tempo real 7900HT Fast Real-Time PCR System (ambos da Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os genes B2M (TaqMan código # Hs00984230_m1), TBP (TaqMan código # Hs00427620_m1), 18S (TaqMan código # Hs99999901_s1), ACTB (TaqMan código # Hs99999903_m1) e GAPDH (TaqMan código # Hs03929097_g1) foram testados para a seleção do controle endógeno de referência (sondas TaqMan da Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram corridas em duplicatas usando um volume final 20μL constituídos por 5μL de cDNA na concentração de 2ng/μL, 1μL da sonda TaqMan (alvo ou endógenas), 10μL do reagente TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 4μL de água ultrapura livre de RNase e DNase; sendo que as condições térmicas de ciclagem usadas foram universais de acordo com orientações do fabricante.

Uma vez realizada a amplificação, o controle endógeno de referência foi determinado pela média geométrica do ciclo limite ou *threshold cycle* (C_T) dos genes B2M e TBP. Esses demostraram ser os dois genes com menor variação entre as amostras quando comparados aos genes 18S, ACTB e GAPDH numa análise de estabilidade realizada com auxilio da ferramenta RefFinder disponível no seguinte endereço eletrônico: http://www.leonxie.com/referencegene.php. Um "*pool*" de 8 amostras de mucosa oral normal obtido do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brasil, foi utilizado como amostra calibradora. Assim sendo, a quantidade relativa (Rq) da expressão do RNAm para o β2-AR em cada amostra foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C}{}_T$, onde C_T = valor do ciclo limite, $\Delta C_T = C_T$ do gene alvo (ADRB2) – C_T do gene endógeno de referência e $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ da amostra testada - ΔC_T da amostra calibradora.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DO β2-AR POR *WESTERN BLOT*

A técnica de *Western blot* foi utilizada para verificar a expressão proteica do β2-AR nas células SCC-9 e SCC-25. Como controle positivo da reação foram empregados os lisados da linhagem de câncer de mama MCF-7, na qual Kang et al. (2014) anteriormente constataram a expressão deste receptor adrenérgico.

Uma vez que as linhagens SCC-9, SCC-25 e MCF-7 alcançaram 80% da confluência, as monocamadas celulares foram lavadas três vezes com a solução salina tamponada com fosfato (PBS = *Phosphate Buffered Saline*) e lisadas em 500µL do tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) contendo inibidores de proteases (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) na concentração final de 1X. Os lisados celulares obtidos foram, então, centrifugados a velocidade 12.000rpm por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes separados para determinação da concentração de proteínas via espectrofotometria pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) com o emprego do kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA). Os lisados celulares de cada uma das linhagens celulares neoplásicas foram coletados em triplicatas.

Para a determinação da expressão do β2-AR, 20µg do lisado de cada amostra de células neoplásicas foi separado por eletroforese em gel de 8% de poliacrilamida e então, transferidos para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). O bloqueio dos sítios inespecíficos da membrana foi realizado com solução contendo 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-Tween 0,05%.

As proteínas de interesse, retidas na membrana, foram sequencialmente detectadas por meio de incubação com o anticorpo primário monoclonal de coelho anti-receptor beta 2 adrenérgico (Cell Signaling Technology, D6H2, Beverly, MA, EUA), na diluição pré-estabelecida de 1:500 em albumina de soro bovino 5%. Posteriormente, realizou-se também a incubação com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-receptor beta 2 adrenérgico (Santa Cruz Biotechnology, sc-9042, Santa Cruz, CA, EUA), na diluição pré-estabelecida de 1:1000 em leite em pó desnatado 5%. Ambos os anticorpos primários β2-AR foram incubados sob agitação

de um dia para o outro a 4°C, seguidos pela incubação com anticorpo secundário conjugado à HRP (*horseradish peroxidase* - GE Healthcare, NA9340, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) por 1 hora a temperatura ambiente e também sob agitação.

Na sequência a membrana foi exposta à reação do luminol ECL (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) por 1 minuto e, então, revelada em filme de raio X (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) para detecção das bandas resultantes. Os filmes foram escaneados e as imagens foram analisadas por densitometria utilizando-se o programa ImageJ versão 1.48 (*Java-based image processing program* – programa de processamento de imagens baseado em Java, National Institutes of Health, EUA).

Como controle do carregamento proteico foi utilizada a detecção do anticorpo primário monoclonal de rato anti-beta-actina (Sigma–Aldrich, A5441, St. Louis, MO, EUA), na diluição pré-estabelecida de 1:10.000. Entre as incubações dos diferentes anticorpos primários, foi realizada a lavagem da membrana com o tampão de NaOH 1M por 5 minutos.

4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR *IN VITRO*

O grau de movimentação celular foi verificado por meio do ensaio de cicatrização de feridas. Após um período de carência de SFB (0,1% SFB por 24h) e da confluência total da monocamada celular na placa de 6 poços, as células neoplásicas (SCC-9 e SCC-25) receberam um pré-tratamento com 10µg/mL de Mitomycina C (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por uma hora a 37°C, para inibir a proliferação celular que poderia influenciar o ensaio.

Foram realizadas então, duas feridas paralelas com uma ponteira estéril de 200µL. Em seguida, as células desprendidas foram retiradas com PBS e as aderidas ao fundo dos poços foram incubadas com meio DMEN/F12 com concentração reduzida de 0,1% de SFB, contendo norepinefrina nas concentrações 0,1, 1 ou 10µM ou propranolol na concentração de 1µM. Nos ensaios de bloqueio do β2-AR, as células neoplásicas foram incubadas com propranolol por 1h a 37°C antes

da aplicação dos 10μM de norepinefrina. Os grupos controles de células neoplásicas SCC-9 e SCC-25 não receberam nenhum estímulo farmacológico.

Uma vez realizada a aplicação das drogas, quatro áreas demarcadas das feridas foram fotografadas no microscópio invertido Nikon Eclipse TE2000-E (Nikon Instruments Inc, Tóquio, Japão), utilizando a objetiva de 10X e o programa NIS Elements versão 3.22 (Nikon Instruments Inc, Tóquio, Japão). As imagens foram registradas nos períodos experimentais de 0, 16, 24, 48 e 72 horas, e as áreas das feridas foram determinadas utilizando-se o programa ImageJ versão 1.48. As porcentagens da cicatrização foram calculadas com base na quantidade de diminuição da área da ferida com relação ao período 0 e então, foram obtidas as médias das porcentagens de cada um dos 6 poços para cada intervalo de tempo. Os ensaios foram realizados em triplicatas para cada uma das linhagens celulares SCC-9 e SCC-25.

4.6 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR *IN VITRO*

A capacidade invasiva das culturas de carcinomas espinocelulares de boca (SCC-9 e SCC-25), em resposta ao estímulo com norepinefrina, foi examinada por meio do sistema de câmeras de invasão *Transwell* de 24 poços (Corning Inc. - Life Sciences, Tewksbury, MA, EUA).

Membranas de policarbonato com poros de 8μm foram uniformemente revestidas com 100μL de uma mistura composta pelo meio DMEM/F12 sem SFB e por Matrigel (BD Bioscienes, San Jose, CA, EUA) na concentração de 200μg/mL. Em seguida, foi permitida a solidificação desta mistura durante a noite, a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. No dia seguinte foi retirado o excedente do meio de cultura não solidificado e então, a matriz formada foi empregada como barreira para interferir no processo de invasão celular.

Na sequência, 4 x 10^4 células de cada umas das linhagens (SCC-9 e SCC-25), foram ressuspendidas, nos poços superiores, em 300μL do meio DMEM/F12 sem SFB e incubadas durante 1 hora a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2, para permitir sua aderência ao fundo dos poços antes do início

dos estímulos farmacológicos.. Após este período de incubação, as células foram tratadas com norepinefrina (0,1; 1 e 10μM) ou com 1μM de propranolol. As células neoplásicas do grupo controle não foram tratadas neste ensaio. No caso do poço correspondente ao experimento de bloqueio do β2-AR, as células SCC-9 e SCC-25 foram incubadas com o propranolol 1h antes da adição da norepinefrina na concentração de 10μM. Nos poços inferiores foram colocados 500μL do meio DMEM/F12 completo suplementado com 10% de SFB para atuar como quimioatraente.

Após um período de incubação de 48 horas a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2, as células neoplásicas não invasoras da câmera superior foram removidas, enquanto que as células neoplásicas que atravessaram as membranas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol absoluto por 5 minutos, coradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos e lavadas duas vezes em água destilada corrente.

Depois de realizada a coloração das células neoplásicas, as membranas foram secas no ambiente, removidas dos poços com o auxilio de um bisturi número 11, colocadas em lâminas de vidro para microscopia óptica e montadas com a utilização de resina adesiva.

As lâminas contendo as células neoplásicas SCC-9 e SCC-25 coradas foram digitalizadas pelo equipamento ScanScope XT (Aperio, Vista, CA, EUA) e analisadas no programa ImageScope versão 12.1.0.5029 (Aperio, Vista, CA, EUA). Então foi obtida a média do número de células neoplásicas coradas e visualizadas na objetiva de 20X em cinco campos aleatoriamente escolhidos por membrana. Todos estes experimentos foram realizados em triplicata de forma independente.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador IBM SPSS *Statistics* versão 20 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA).

As diferenças das médias obtidas nos diferentes experimentos com SCC-9 e SCC-25, de invasão e migração celular e da expressão proteica do β2-AR, foram comparadas pelo teste t de Student. Para todos os testes, um nível igual ou inferior a 5% ($p \leq 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo.

4.8 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, em reunião do dia 24 de abril de 2013, sob o número CAAE: 14034013.0.0000.5417 (Anexo A).

5 Resultados

5 REULTADOS

5.1 EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPOR BETA 2 ADRENÉRGICO

Os resultados da quantificação relativa do RNAm para o β2-AR revelaram que, quando comparadas ao "*pool"* de mucosa oral normal, ambas as linhagens de carcinoma espinocelular de boca (SCC-9 e SCC-25) apresentaram uma menor expressão do gene para este receptor adrenérgico (Gráfico 1).

Além disso, comparando-se as duas linhagens celulares observamos que a expressão constitutiva relativa do RNAm do β2-AR foi menor nas células SCC-9 (Rq=0,12) do que nas células SCC-25 (Rq=0,26), como pode ser observado no Gráfico 1.

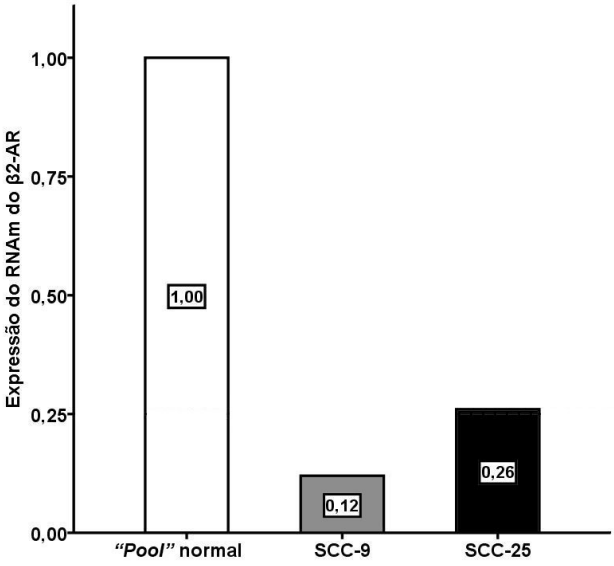


Gráfico 1 - Expressão do RNAm para o β2-AR em amostras de mucosa oral normal e em linhagens de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9 e SCC-25). A expressão gênica constitutiva relativa foi medida por RT-qPCR e normalizada para a média geométrica dos níveis dos genes TBP e B2M. As barras representam a expressão gênica relativa do β2-AR de cada amostra, o "pool" de mucosa oral normal que foi utilizado como amostra calibradora de referência.

5.2 EXPRESSÃO PROTEICA DO RECEPTOR BETA 2 ADRENÉRGICO

Após detectar a baixa expressão constitutiva do gene do β2-AR nas células SCC-9 e SCC-25 (Gráfico 1), decidiu-se verificar a presença proteica do receptor nestas linhagens de carcinoma espinocelular de boca.

Assim sendo, a análise de *Western blot* de lisados celulares das linhagens SCC-9 e SCC-25 revelaram que ambas as células expressam o β2-AR (Figura 2). Foram detectadas múltiplas bandas imunorreativas do anti-β2-AR que foram categorizadas (SALAHPOUR et al. 2003) em três grupos principais:

- bandas com peso molecular entre 45 a 50kDa - β2-AR no estado monomérico;
- bandas entre 52 e 76kDa - glicosilação heterogênea do β2-AR;
- bandas de ≈100kDa - β2-AR no estado de dimerização.

Do ponto de vista quantitativo, os cálculos densitométricos realizados confirmaram os resultados do RT-qPCR, uma vez que a linhagem SCC-9 apresentou uma menor expressão proteica do β2-AR quando comparada à linhagem SCC-25, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa com nenhum dos anticorpos utilizados: com o anticorpo primário anti-β2-AR D6H2 (p=0,143) e com o anticorpo primário anti-β2-AR sc-9042 (p=0,481), como ilustrado no Gráfico 2.

5.3 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDA - MIGRAÇÃO CELULAR *IN VITRO*

Uma vez verificada a expressão gênica e proteica do β2-AR pelas linhagens SCC-9 e SCC-25, foi avaliada a resposta funcional do ponto de vista da migração celular quando estimuladas com a catecolamina norepinefrina em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10μM) e com 1μM do bloqueador propranolol. As análises foram feitas às 16, 24, 48 e 72 horas após os estímulos farmacológicos.

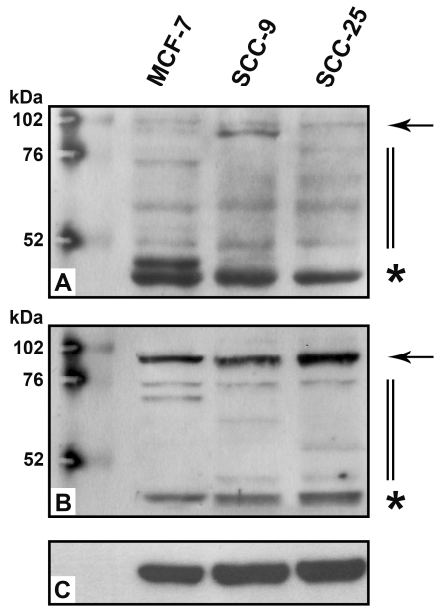


Figura 2 - Análise de *Western blot* da expressão proteica do β2-AR em linhagens de adenocarcinoma humano de mama (MCF-7) e de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9 e SCC-25). A: análise feita com o anticorpo primário anti-β2-AR D6H2. B: análise feita com o anticorpo primário anti-β2-AR sc-9042. C: Beta actina. kDa: kilodaltons; *: bandas consistentes com o estado monomérico do receptor; ‖: bandas consistentes com o estado de glicosilação do receptor; ←: bandas consistentes com a dimerização do receptor.

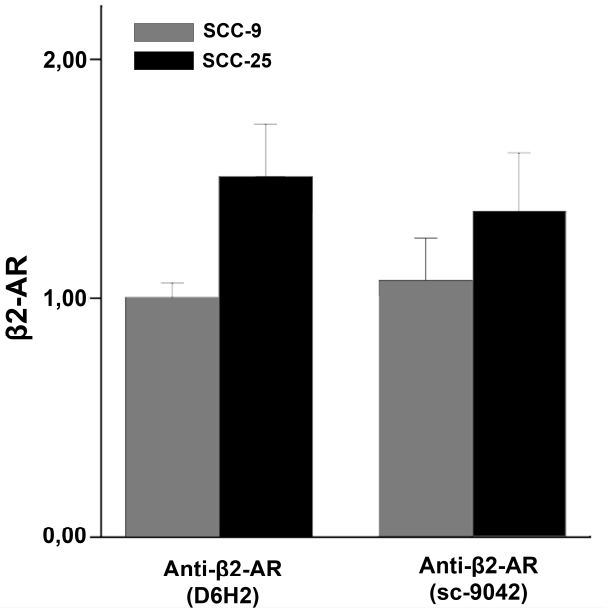


Gráfico 2 – Expressão proteica do β2-AR em linhagens de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9 e SCC-25). Densitometria das bandas obtidas para cada anticorpo primário.

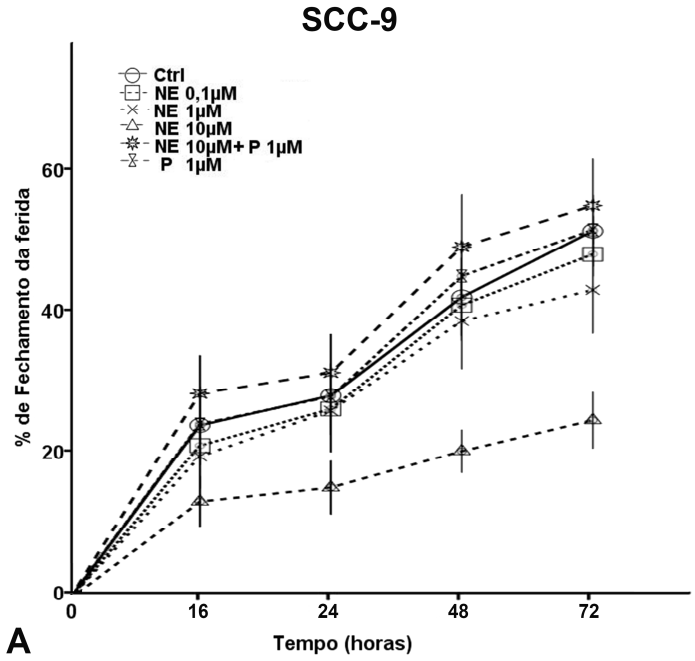
5.3.1 Resposta migratória da linhagem SCC-9

Como apresentado no Gráfico 3, as células SCC-9 que foram estimuladas com norepinefrina demostraram uma tendência à diminuição dose-dependente das taxas do fechamento da ferida quando comparadas ao controle. Esta redução da migração celular mediada pela norepinefrina foi estatisticamente significativa nos ensaios realizados com 10μM da droga após 48 e 72 horas dos estímulos farmacológicos, onde foi observado que as células SCC-9 migraram, respectivamente, 51% (p=0,048) e 51,33% (p=0,028) menos que as células do grupo controle sem tratamento.

Por outro lado, o bloqueio prévio com propranolol demostrou uma clara tendência a reverter o efeito induzido pela norepinefrina, sendo que a migração das células tratadas com 1μM de propranolol antes do estímulo com 10μM de norepinefrina foi superior à observada nas células tratadas somente com os 10μM de norepinefrina (p=0,126 para as 16 horas; p=0,115 para as 24 horas; p=0,042 para as 48 horas e p= 0,034 para as 72 horas) (Gráfico 3). As porcentagens de fechamento das feridas observadas nos poços das células tratadas com 1μM de propranolol antes da aplicação dos 10μM de norepinefrina não foram significativamente diferentes das porcentagens observadas nos poços das células controle sem tratamento (p=0,632 para as 16 horas; p=0,727 para as 24 horas; p=0,564 para as 48 horas e p= 0,746 para as 72 horas) (Gráfico 3).

Em relação ao tratamento unicamente com propranolol, não foram verificadas mudanças significativas no fechamento da ferida com relação aos controles em nenhum dos tempos analisados (p=0,979 às 16 horas, p=0,985 às 24 horas, p=0,724 às 48 horas e p=0,981 às 72 horas) (Gráfico 3).

A Figura 3 ilustra as respostas migratórias da linhagem SCC-9 após 48h dos estímulos farmacológicos nos ensaios de cicatrização de feridas.



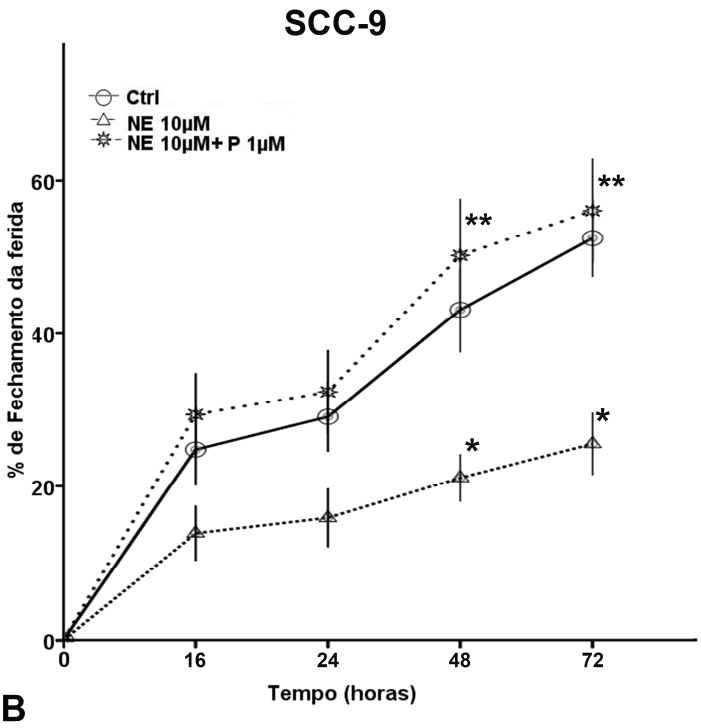


Gráfico 3 – Migração das células SCC-9 tratadas com diferentes concentrações de norepinefrina, de propranolol ou ambas, após 16, 24, 48 e 72h. Em A, nota-se todos os resultados obtidos e em B, detalhe das diferenças estatisticamente significativas encontradas entre as células tratadas com 10µM de norepinefrina em relação ao controle e em relação ao grupo de células que receberam 1µM de propranolol antes dos 10µM de norepinefrina. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol; *: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao controle sem tratamento; **: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao tratamento com 10µM de norepinefrina. As barras de erro representam o erro padrão das médias.

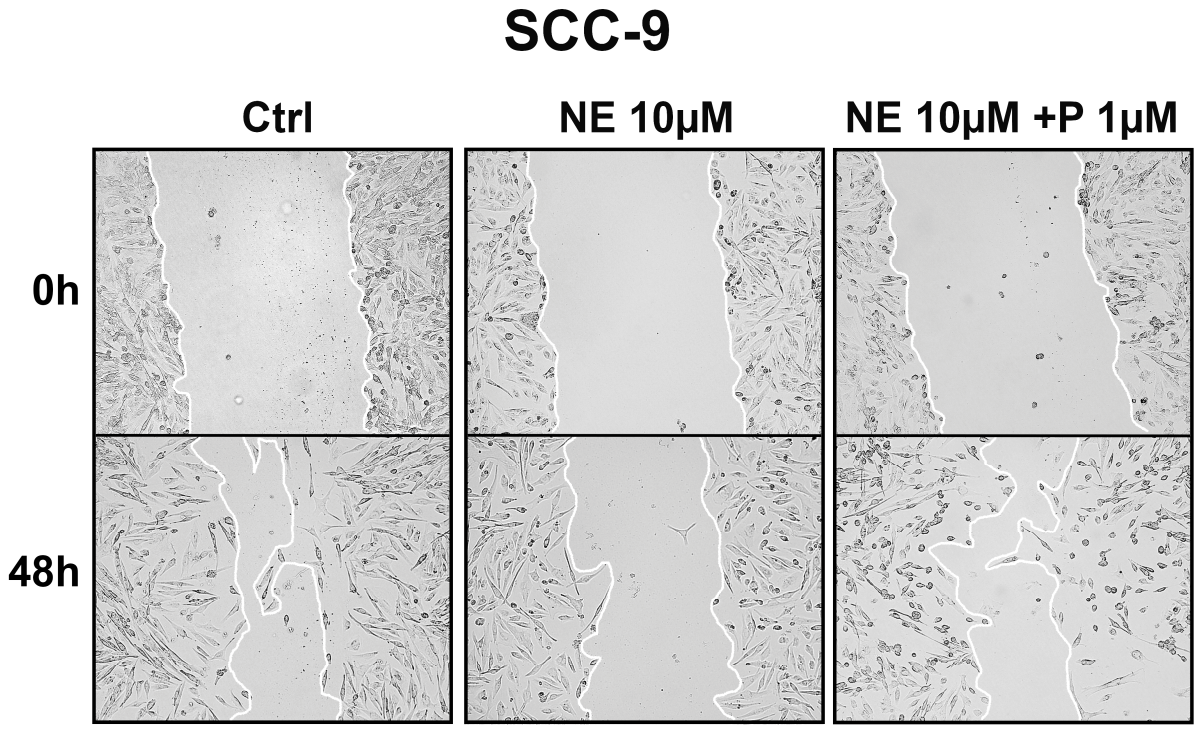


Figura 3 – Imagens representativas da resposta migratória da linhagem de carcinoma espinocelular de boca SCC-9 após 48h dos estímulos farmacológicos nos ensaios de cicatrização de feridas. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol.

5.3.2 Resposta migratória da linhagem SCC-25

Em relação às porcentagens de fechamento das feridas realizadas em culturas confluentes da linhagem SCC-25, o estímulo com 0,1μM de norepinefrina produziu uma diminuição das taxas migratórias destas células, sendo que foram registradas diferenças significativas apenas após 24 horas do início o ensaio (p=0,019) (Gráfico 4).

Quando as células foram estimuladas com 1μM de norepinefrina, foi observado um comportamento irregular referente à migração celular nos diferentes períodos experimentais analisados. Inicialmente, houve uma redução da migração das células SCC-25 nos tempos de 16h (p=0,119) e 24h (p=0,038), sendo a diferença neste último período significativa com relação ao controle. Porém, após 48 e 72 horas do início do ensaio, as células incrementaram as taxas migratórias em relação ao controle, contudo sem diferenças estatisticamente significativas (p=0,345 e p=0,190, respectivamente) (Gráfico 4).

Como pode ser observado no Gráfico 4, em todos os períodos, o estímulo com 10μM de norepinefrina resultou em uma nítida diminuição das porcentagens do fechamento da ferida com relação às células não estimuladas, assim sendo, a capacidade migratória foi reduzida em um 54,47% (p=0,011), 59,18% (p=0,001), 54,16% (p=0,006) e 56,77% (p= 0,011), respectivamente às 16, 24, 48 e 72 horas (Gráfico 4).

Por outro lado, o bloqueio anterior com 1μM de propranolol reverteu o efeito induzido pela norepinefrina nos diferentes tempos analisados, assim sendo, as médias da porcentagem de migração das células que receberam propranolol prévio ao tratamento com norepinefrina foram significativamente superiores às observadas nas células tratadas somente com os 10μM de norepinefrina (p=0,011 para as 16 horas; p=0,012 para as 24 horas; p=0,033 para as 48 horas e p= 0,023 para as 72 horas) (Gráfico 4). Além disso, não existiram diferenças significativas na migração entre as células tratadas com propranolol antes dos 10μM de norepinefrina e aquelas que não receberam tratamento farmacológico algum (p=0,384 para as 16 horas; p=0,090 para as 24 horas; p=0,110 para as 48 horas e p= 0,166 para as 72 horas) (Gráfico 4).

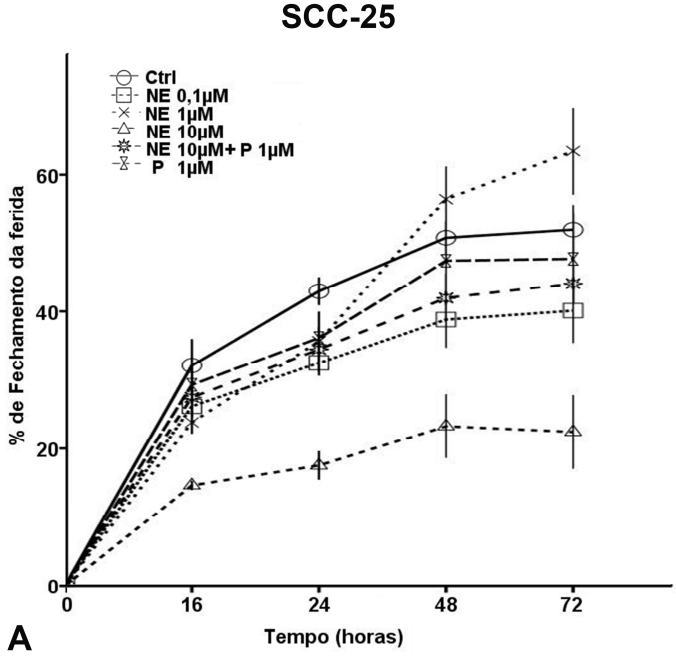
O tratamento unicamente com propranolol não resultou em mudanças significativas do fechamento da ferida com relação aos controles em nenhum dos tempos analisados (p=0,586 às 16 horas, p=0,191 às 24 horas, p=0,556 às 48 horas e p=0,605 às 72 horas) (Gráfico 4).

A Figura 4 ilustra as respostas migratórias da linhagem SCC-25 após 48h dos estímulos farmacológicos nos ensaios de cicatrização de feridas.

5.3.3 Comparação da resposta migratória nas linhagens SCC-9 e SCC-25

Os resultados dos ensaios de cicatrização de feridas demostraram que a norepinefrina modulou negativamente a resposta migratória das linhagens SCC-9 e SCC-25. Como pode ser visualizado nos Gráficos 3 e 4, em ambas as linhagens esta catecolamina induziu efeitos inibitórios na movimentação celular, entretanto, somente a maior concentração de norepinefrina utilizada (10μM) mostrou resultados estatisticamente significativos na linhagem SCC-9 quando comparado ao controle (células sem tratamento).

Por outro lado, foi observado que a linhagem SCC-25 apresentou uma maior sensibilidade ao estimulo com norepinefrina. Todas as concentrações testadas tiveram a capacidade de reduzir significativamente a porcentagem da migração celular ao longo do tempo e, se comparado estes resultados com aqueles da linhagem SCC-9, observa-se que o estímulo com 10μM de norepinefrina diminuiu marcadamente a mobilidade celular em todos os tempos analisados (Gráficos 3 e 4).



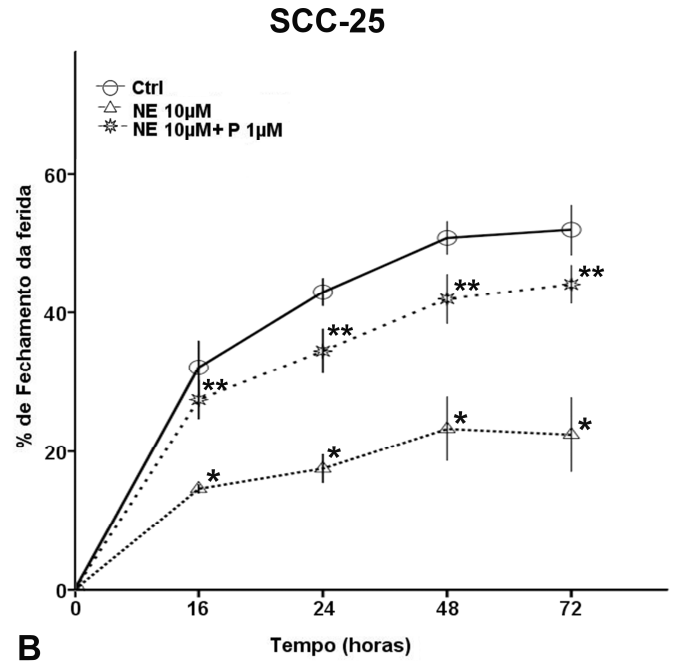


Gráfico 4 – Migração das células SCC-25 tratadas com diferentes concentrações de norepinefrina, de propranolol ou ambas, após 16, 24, 48 e 72h. Em A, nota-se todos os resultados obtidos e em B, detalhe das diferenças estatisticamente significativas encontradas entre as células tratadas com 10µM de norepinefrina em relação ao controle e em relação ao grupo de células que receberam 1µM de propranolol antes dos 10µM de norepinefrina. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol; *: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao controle sem tratamento; **: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao tratamento com 10µM de norepinefrina. As barras de erro representam o erro padrão das médias.

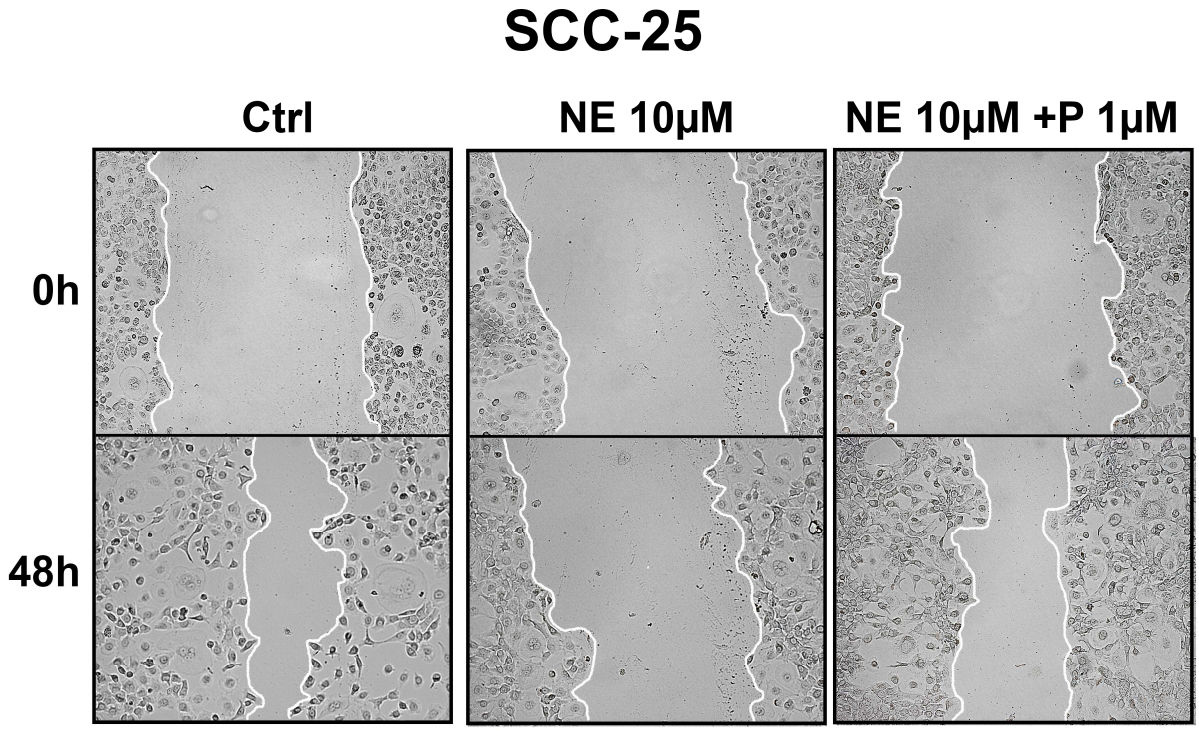


Figura 4 – Imagens representativas da resposta migratória da linhagem de carcinoma espinocelular de boca SCC-25 após 48h dos estímulos farmacológicos nos ensaios de cicatrização de feridas. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol.

5.4 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR *IN VITRO*

Os efeitos da norepinefrina na capacidade invasiva das células SCC-9 e SCC-25 foram avaliados pelo ensaio de invasão celular *in vitro*.

5.4.1 Resposta invasiva da linhagem SCC-9

Como apresentado no Gráfico 5, o estímulo com norepinefrina nas concentrações de 0,1 e 1μM resultou numa marcada tendência inibitória da invasão celular; sendo estas concentrações responsáveis pela redução, respectivamente, de 32,71% (p=0,069) e 34,4% (p=0,059) do número de células SCC-9 invasoras, quando comparadas aos controles. Por outro lado, a concentração de 10μM diminuiu significativamente a invasão celular (46,71% de redução) com relação às células não estimuladas (p=0,04), como ilustrado no Gráfico 5.

Quanto ao tratamento com propranolol, a aplicação do bloqueador prévio ao estímulo com norepinefrina atenuou o efeito inibitório da catecolamina na invasão celular, porém não houve diferença significativa entre as células SCC-9 submetidas ao propranolol previamente ao tratamento com norepinefrina e as células tratadas unicamente com 10μM de norepinefrina (p=0,066) (Gráfico 5). A quantidade de células SCC-9 invasoras não diferiu significativamente entre aquelas que receberam a aplicação isolada do propranolol e as outras sem tratamento (p=0,591), como visualizado no Gráfico 5.

A Figura 5 ilustra as respostas invasivas da linhagem SCC-9, após 48 horas, com ou sem estímulos farmacológicos.

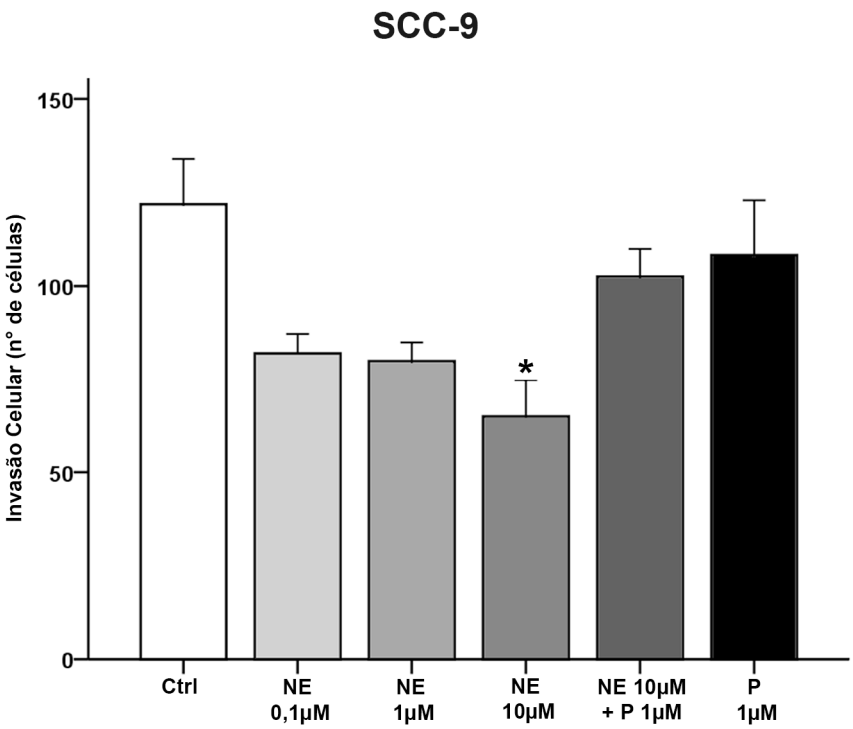


Gráfico 5 – Células SCC-9 invasoras após os tratamentos com norepinefrina, propranolol ou ambas. A quantidade de células representa a média de cinco campos microscópicos analisados por tratamento. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol; *: nível de significância igual ou inferior a 5% ($p \leq 0,05$) comparada ao controle sem tratamento. As barras de erro representam o erro padrão das médias.

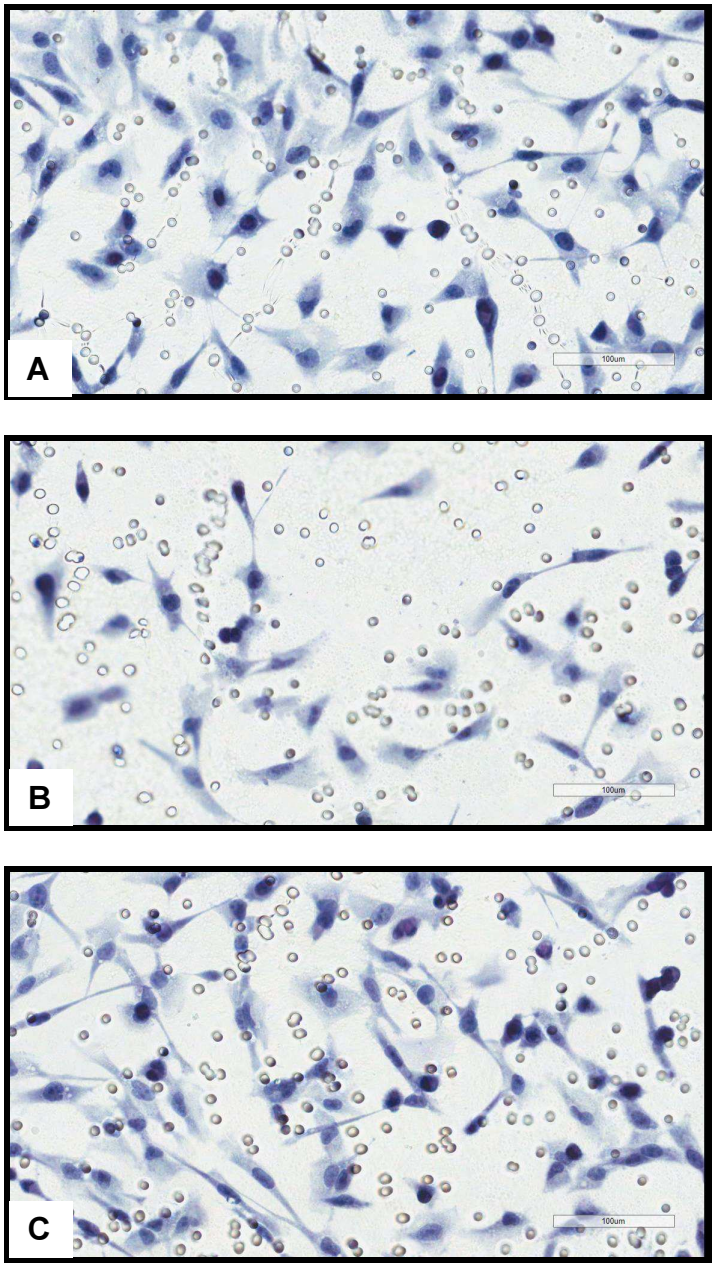


Figura 5 – Invasão celular da linhagem de carcinoma espinocelular humano de boca SCC-9. A: células controle sem tratamento, B: células estimuladas com 10μM de norepinefrina. C: células com tratamento com 1μM de propranolol prévio à aplicação de 10μM de norepinefrina.

5.4.2 Resposta invasiva da linhagem SCC-25

Como apresentado no Gráfico 6, a norepinefrina provocou uma redução dose-dependente da capacidade invasiva da linhagem SCC-25. A estimulação das células SCC-25 com 0,1μM e 1μM de norepinefrina induziu a diminuição respectiva de 35,99% (p=0,021) e 47,05% (p=0,012) da invasividade celular quando comparadas aos controles sem tratamento. Além disso, as células SCC-25 atingiram seu ponto máximo de redução (50,98%; p=0,019) quando tratadas com a dose de 10μM de norepinefrina, enquanto que, o pré-tratamento com o antagonista propranolol reverteu parcialmente os efeitos induzidos pela catecolamina (p=0,209) relativo ao grupo com aplicação de 10μM de norepinefrina (Gráfico 6).

As células SCC-25 que foram submetidas ao tratamento isolado com propranolol não demostraram diferenças significativas na invasão celular com relação às células que não receberam nenhum estímulo (p=0,165) (Gráfico 6).

A Figura 6 ilustra as respostas invasivas da linhagem SCC-25, após 48 horas, com ou sem estímulos farmacológicos.

5.4.3 Comparação da resposta invasiva nas linhagens SCC-9 e SCC-25

Em análise global dos resultados, notou-se que a norepinefrina reduziu a invasão de ambas as linhagens celulares (SCC-9 e SCC-25), entretanto, estes efeitos foram somente bloqueados de maneira parcial pelo uso do antagonista propranolol (Gráficos 5 e 6).

Quando comparadas as respostas das linhagens SCC-9 e SCC-25, foram observados efeitos superiores na linhagem SCC-25, pois nesta linhagem se detectaram os maiores porcentagens de redução da invasão celular e ainda porque seu potencial invasivo foi significativamente reduzido por todas as concentrações de norepinefrina empregadas (Gráficos 5 e 6).

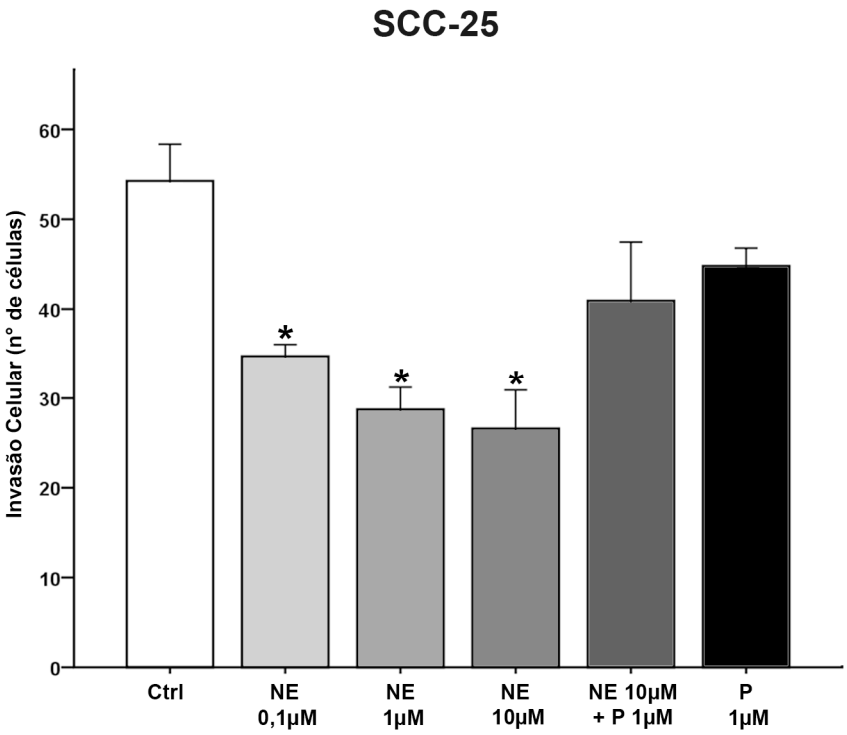


Gráfico 6 – Células SCC-25 invasoras após os tratamentos com norepinefrina, propranolol ou ambas. A quantidade de células representa a média de cinco campos microscópicos analisados por tratamento. Ctrl: controle; NE: norepinefrina; P: propranolol; *: nível de significância igual ou inferior a 5% (p≤0,05) comparada ao controle sem tratamento. As barras de erro representam o erro padrão das médias.

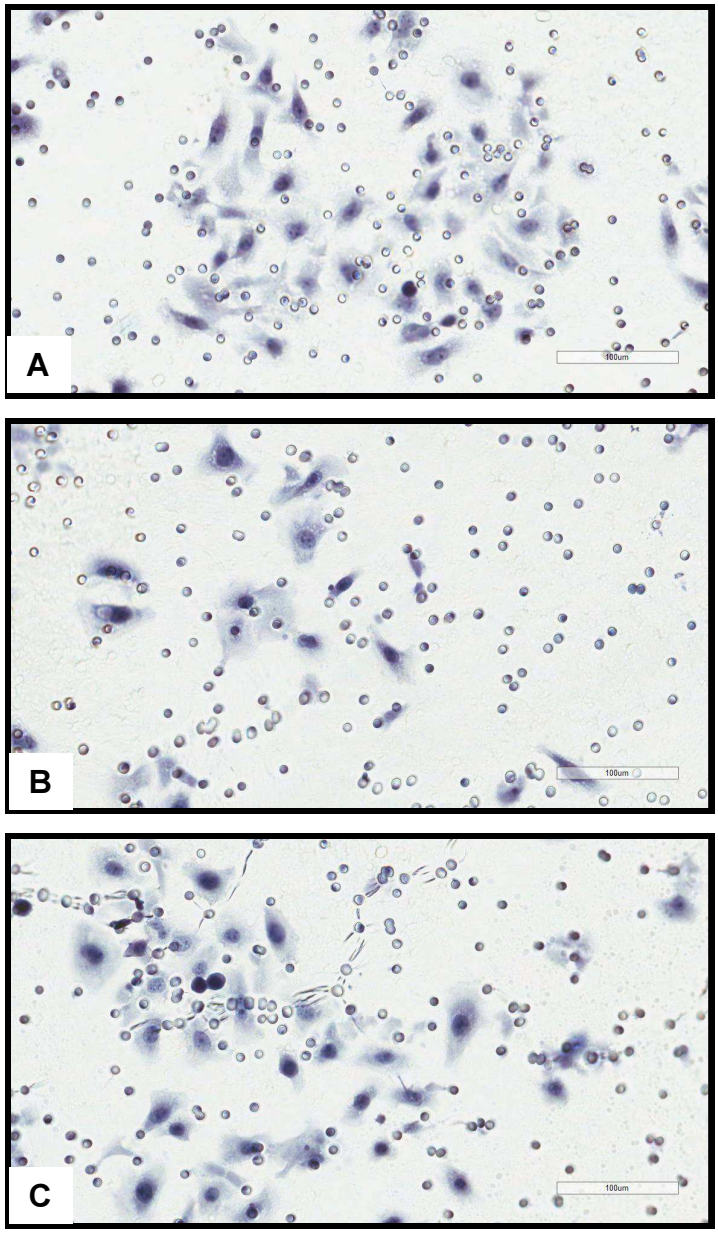


Figura 6 – Invasão celular da linhagem de carcinoma espinocelular humano de boca SCC-25. A: células controle sem tratamento, B: células estimuladas com 10μM de norepinefrina. C: células com tratamento com 1μM de propranolol prévio à aplicação de 10μM de norepinefrina.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O nosso interesse na investigação do β2-AR na biologia tumoral foi motivado, em principio, pelos achados epidemiológicos que sugeriram uma possível associação entre o estresse e o câncer (LILLBERG et al., 2003; METCALFE et al., 2007), e mais recentemente, pelas observações clínicas que mostraram uma menor progressão tumoral e melhores taxas de sobrevida em pacientes com câncer que foram tratados com beta bloqueadores adrenérgicos (β-ARs) para hipertensão, antes do diagnóstico de câncer (POWE et al., 2010; CHOI et al., 2014).

Especificamente em relação ao CEC de boca, são poucas as pesquisas que avaliaram o papel do β2-AR nesta neoplasia maligna. Estudos em linhagens neoplásicas de CEC de boca indicaram que o β2-AR está associado à progressão da doença tendo em vista que sua sinalização modulou positivamente a proliferação, a secreção de IL-6 e a quimiotaxia de células neoplásicas (SHANG; LIU; LIANG, 2009; BERNABÉ et al., 2011). Entretanto, nosso grupo de pesquisa em um estudo retrospectivo, incluindo 106 pacientes com câncer de boca, observou de maneira intrigante que a forte expressão imuno-histoquímica do β2-AR pelas células tumorais foi fator de prognóstico favorável, ou seja, estava associada a maiores taxas de sobrevida destes pacientes (BRAVO-CALDERÓN et al., 2011).

Diante dessas discrepâncias entre os achados clínicos e laboratoriais, o presente estudo foi idealizado com o intuito de trazer contribuições sobre a importância da ativação do β2-AR, via mediador do estresse, na migração e na invasão das células malignas do câncer de boca, funções estas consideradas pré-requisito essenciais para o desenvolvimento das metástases (THAKER; SOOD, 2008; BRAADLAND et al., 2014).

No presente estudo, a norepinefrina foi a catecolamina escolhida para avaliar a importância da ativação do β2-AR no câncer de boca, pois, além de ser um agonista natural deste receptor, é considerada o principal mediador químico do estresse no microambiente tumoral (COLE; SOOD, 2012). Como resultado do estresse o sistema nervoso simpático regula a sinalização dos β-ARs por meio do

incremento dos níveis circulatórios de norepinefrina e epinefrina, e pela produção local de norepinefrina pelos feixes nervosos simpáticos (CHROUSOS, 1998; ANTONI et al., 2006). Assim sendo, análises realizadas em carcinomas de ovário verificaram que os níveis tumorais da norepinefrina foram maiores do que os níveis circulatórios (COLE; SOOD, 2012). Portanto, as concentrações de norepinefrina utilizadas no presente estudo simularam as condições de estresse tanto nos níveis circulatórios (0,1μM de norepinefrina) como nos níveis teciduais (10μM de norepinefrina) e foram baseadas também nas respostas prévias obtidas nas linhagens SCC-9 e SCC-25 por outros investigadores (BERNABÉ et al., 2011; VILARDI et al., 2013).

As expressões gênica e proteica do β2-AR nas células SCC-9 e SCC-25 foram detectadas por RT-qPCR e *Western blot,* sendo maior nas células SCC-25 (Gráficos 1 e 2), o que confirmou relatos prévios que demostraram a presença deste receptor em células epiteliais neoplásicas do CEC boca (SHANG; LIU; LIANG, 2009; BERNABÉ et al., 2011; BRAVO-CALDERÓN et al., 2011).

A comparação da expressão do β2-AR entre a mucosa oral normal e linhagens de CEC de boca, demostrou uma menor expressão deste receptor em ambas as linhagens (SCC-9 e SCC-25), como pode ser observado no Gráfico 1. Esses resultados são contrastantes com aqueles encontrados por Bernabé et al. (2011), onde a expressão de β2-AR foi muito semelhante entre a mucosa oral normal e os CEC de boca e de Shang, Liu e Liang (2009) que demonstraram níveis significativamente superiores de β2-AR em CEC de boca do que em mucosas orais normais. Provavelmente estas diferenças na expressão do β2-AR encontrado no presente estudo com aqueles dos outros autores (SHANG; LIU; LIANG, 2009; BERNABÉ et al., 2011) ocorreram devido a diversidade das técnicas de pesquisa empregadas nestes experimentos, como por exemplo, a realização do RT-PCR a partir de espécimes teciduais usada por Bernabé et al (2011) pode ter incluído outras células do microambiente tumoral que também expressavam o β2-AR.

Deve ser ressaltado que, a análise da expressão proteica do β2-AR nas linhagens SCC-9 e SCC-25 foi realizada por meio do *Western blot,* usando dois anticorpos primários anti-β2-AR de marcas comerciais diferentes (D6H2, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA e sc-9042, Santa Cruz Biotechnology,

Santa Cruz, CA, EUA) para confirmar a especificidade destes anticorpos devido a presença de múltiplas bandas imunorreativas encontradas. A observação das múltiplas bandas encontradas com o emprego dos dois anticorpos primários anti-β2-AR (Figura 2), conjuntamente com a semelhança dos resultados obtidos nos cálculos densitométricos (Gráfico 2), validou a expressão proteica do β2-AR para ambos os anticorpos. Esses resultados reforçam aqueles de Salahpour et al (2003) ao demonstrarem que o aparecimento de múltiplas bandas não resulta de erros da técnica e sim da resistência das espécies diméricas e glicosadas do β2-AR aos agentes redutores usados durante o preparo das amostras para a técnica de *Western blot.*

A resposta do estímulo do receptor β2-AR por mediador do estresse, a norepinefrina, na migração e na invasão das células SCC-9 e SCC-25, mostrou resultados interessantes e muito semelhantes nas duas linhagens de carcinoma espinocelular de boca.

Nossos resultados mostraram que a norepinefrina reduziu a migração e a invasão das células SCC-9 e SCC-25, sendo que a maior concentração da catecolamina (10μM) foi a única capaz de modular ambas as funções das duas linhagens de câncer de boca (Gráficos 3, 4, 5 e 6). A comparação destes resultados com outros da literatura científica inglesa ficou limitada, pois não foram encontradas investigações relativas à modulação da migração e da invasão de células de câncer de boca, pela ativação direta do β2-AR, por mediadores do estresse como a norepinefrina.

Entretanto, nossos resultados em linhagens de queratinócitos malignos são consistentes com outros previamente publicados que indicam que o estímulo do β2-AR inibiu a migração celular de queratinócitos humanos normais da pele e da mucosa oral. (SIVAMANI et al., 2009; STEENHUIS et al., 2011). Steenhuis et al. (2011) ao investigarem se os mediadores do estresse comprometiam a regeneração da mucosa oral, verificaram que o β2-AR foi o principal subtipo de receptor adrenérgico expresso em queratinócitos orais humanos e, concluíram, que sua ativação pela epinefrina diminuiu a velocidade da migração celular interferindo com a cicatrização das feridas experimentais. Além disso, o tratamento com o antagonista dos β-ARs, o timolol, reverteu os efeitos da epinefrina. Com base nestes resultados,

os autores (STEENHUIS et al., 2011) sugeriram que a aplicação tópica de antagonistas do β2-AR poderia ser considerada uma alternativa terapêutica para melhorar a regeneração da mucosa oral.

Ao confrontarmos os resultados descritos acima com aqueles encontrados em nosso estudo, podemos concluir que a ativação dos β2-AR, pelos mediadores do estresse, prejudica a cicatrização de feridas orais, mas também causa efeitos inibitórios na migração e na invasão de células epiteliais neoplásicas de CEC de boca.

Nas células malignas, os estudos relativos aos efeitos da ativação do β2-AR na migração e invasão celular, têm demostrado resultados contrastantes dependendo do tipo de câncer, da linhagem celular estimulada, da via de sinalização envolvida e da quantidade de receptor expresso pelas células neoplásicas malignas (MASUR et al., 2001; SOOD et al., 2006; YANG et al., 2006; YU et al., 2007; SHANG; LIU; LIANG, 2009; MORETTI et al., 2013; GARGIULO et al., 2014; WANG et al., 2015; WNOROWSKI et al., 2015).

Assim sendo, como observado *in vitro,* o estímulo do β2-AR pela norepinefrina provocou o aumento da migração de células de câncer de cólon, via ativação das tirosinas quinases Src (MASUR et al., 2001). Adicionalmente, as catecolaminas, via sinalização dos β-ARs, mediaram o aumento de MMP-2 e MMP-9 e incrementaram assim, a invasão celular de linhagens de carcinoma de ovário e de nasofaringe (SOOD et al., 2006; YANG et al., 2006). Por outro lado, Wang et al. (2015) recentemente reportaram que o estímulo do β2-AR pela norepinefrina em células de câncer de mama causou a diminuição da expressão do receptor de quimiocinas CXCR4 e da correspondente invasão celular em direção de seu ligante endógeno, o CXCL12.

Algumas observações recentes em diferentes linhagens de melanoma humano demostraram que os efeitos do estímulo do β2-AR podem variar nos modelos celulares do mesmo tipo de tumor (MORETTI et al., 2013; WNOROWSKI et al., 2015). Enquanto Moretti et al. (2013) observaram que o estímulo do β2-AR aumentou a invasão das linhagens A375 e Hs294T de melanoma, Wnorowski et al. (2015) demostraram que o tratamento das células UACC-647, M93-047 e UACC-903, também de melanoma humano, com agonistas específicos do β2-AR

reduziram, significativamente, a migração e a invasão destas células neoplásicas malignas.

Estas diferenças em termos de migração e invasão celular entre os diferentes trabalhos científicos podem ser atribuídas, em parte, a complexidade e a heterogeneidade das vias de sinalização do β2-AR. A ativação do β2-AR resulta na formação do segundo mensageiro cAMP que por sua vez poderá estimular à PKA ou a EPAC (COLE; SOOD, 2012) (Figura 1). Em conjunto estas moléculas podem fosforilar diferentes substratos, assim, estimulando ou inibindo as funções das células neoplásicas (MADDEN; SZPUNAR; BROWN, 2011). Por exemplo, Madden, Szpunar e Brown (2011) observaram que a via de sinalização β2-AR-cAMP-PKA modulou a produção de VEGF de maneira direccionalmente oposta; incrementou a produção de VEGF pelas células de câncer de mama MDA-MB-231BR e ~~a~~ inibiu nas células MDA-MB-231.

Embora os efeitos da ativação de β2-AR por norepinefrina em diferentes processos celulares de linhagens de CEC de boca tenham sido estudados, as vias de sinalização envolvidas nas respostas do estímulo deste receptor nestes tumores malignos não foram profundamente analisadas (SHANG; LIU; LIANG, 2009; BERNABÉ et al., 2011; VILARDI et al., 2013).

Particularmente em relação ao CEC de boca, Shang, Liu e Liang (2009) reportaram um aumento dose-dependente da invasão celular induzida por efeito quimiotático da norepinefrina através de membranas basais reconstituídas, resultado este contrastante com aquele observado em nossos experimentos. As diferenças referentes à invasão de células neoplásicas do câncer de boca, encontradas entre o presente trabalho e o de Shang, Liu e Liang (2009), podem ter ocorrido em função das metodologias empregadas pois, enquanto Shang, Liu e Liang (2009) avaliaram a quimioatração das células neoplásicas do CEC de boca em direção a norepinefrina, no presente estudo, esta catecolamina foi utilizada para estimular diretamente os β2-AR nas células SCC-9 e SCC-25.

Além das vias de sinalização do β2-AR, os níveis de expressão deste receptor tem se mostrado importantes para a regulação do fenótipo das células neoplásicas (YU et al., 2007; GARGIULO et al., 2014; WNOROWSKI et al., 2015).

Yu et al. (2007) reportaram que o silenciamento gênico do β2-AR induziu um fenótipo oncogênico em células benignas de próstata, pois estas apresentaram incremento da migração e da invasão celular quando comparadas ao controle. Verificaram também que, tumores metastáticos de próstata apresentaram níveis mais fracos de expressão imuno-histoquímica do β2-AR quando comparados a amostras de tecido prostático normal, de neoplasia intra-epitelial de próstata e de carcinoma de próstata localizado. A análise da sobrevida livre de doença de pacientes com carcinomas localizados de próstata revelou que os escores baixos de expressão do β2-AR foram associados significativamente com a recidiva tumoral, quando comparados aos altos escores de expressão desta proteína. Adicionalmente, o modelo de regressão de Cox indicou o β2-AR como um fator independente de prognóstico para o câncer de próstata.

Outro estudo (GARGIULO et al., 2014) comprovou que em células de câncer de mama (MCF-7) com baixa expressão do β2-AR a epinefrina, atuando nos receptores alfa adrenérgicos, incrementou a migração celular. Entretanto, foi registrada uma redução significativa da migração celular quando o β2-AR foi superexpresso nas células MCF-7 (GARGIULO et al., 2014). Adicionalmente, Wnorowski et al. (2015) ao estudar os efeitos de agonistas farmacológicos do β2-AR em linhagens de melanoma, observaram que a ativação deste receptor provocou a redução da migração e da invasão das células de melanoma. Reportaram ainda, que o efeito inibitório do agonista farmacológico estava correlacionado positiva e significativamente com os níveis de expressão do β2-AR nas células neoplásicas.

Em concordância com Wnorowski et al. (2015), no presente estudo observamos que na linhagem SCC-9, com menor expressão do β2-AR, somente a maior concentração de 10μM norepinefrina causou efeitos anti-migratórios e anti-invasivos (Gráficos 3 e 5). Por outro lado, a linhagem SCC-25, com maior expressão do β2-AR, apresentou uma maior sensibilidade à norepinefrina, demostrada pelo fato de que todas as concentrações testadas (0,1; 1 e 10μM de norepinefrina) causaram inibição significativa da migração e/ou da invasão celular, quando comparadas aos controle sem tratamento (Gráficos 4 e 6). Estes resultados, *in vitro*, corroboram com nosso estudo retrospectivo prévio onde demostramos que a forte expressão do imuno-histoquímica do β2-AR nas células epiteliais neoplásicas de CEC de boca,

influenciou positivamente a evolução tumoral, ou seja, a forte expressão do β2-AR foi associada as maiores sobrevidas global e por câncer, sendo um fator de prognóstico favorável independente nos pacientes com câncer de boca (BRAVO-CALDERÓN et al., 2011).

Com relação ao bloqueio dos β-ARs, foi observado que o tratamento prévio com propranolol atenuou os efeitos da norepinefrina sobre a migração e a invasão das células SCC-9 e SCC-25 (Gráficos 3, 4, 5 e 6), demostrando assim o envolvimento do β2-AR nos efeitos da catecolamina.

Diferentes pesquisas constataram que fármacos beta bloqueadores diminuíram a progressão de tumores malignos em pacientes com câncer (POWE et al., 2010; CHOI et al., 2014). Entretanto, nestes estudos a maior parte dos pacientes foi tratada com bloqueadores seletivos para os receptores adrenérgicos beta 1, e ainda, a administração das drogas foi sistêmica visando o tratamento da hipertensão, o que não permitiu certificar se o efeito anti-tumoral está relacionado a ação direta dos beta bloqueadores nas células neoplásicas ou se é mediado pela regulação de outras células que também expressam β-ARs, como as células do sistema imune (POWE et al., 2010; COLE; SOOD, 2012; BRAADLAND et al., 2014; CHOI et al., 2014). Adicionalmente, devemos mencionar que não encontramos nenhuma análise clínica-epidemiológica relativa ao uso de bloqueadores beta adrenérgicos em pacientes com CEC de boca.

Outros estudos comprovaram que o propranolol pode modular a proliferação de células neoplásicas de câncer de pâncreas, agindo como agonista inverso independente do bloqueio da ação das catecolaminas (ZHANG et al., 2009). No presente estudo, o tratamento isolado do propranolol nas células neoplásicas não causou diferenças na migração e na invasão celular com relação aos controles sem tratamento (Gráficos 3, 4, 5 e 6). Assim sendo, nossos resultados indicam que nas células SCC-9 e SCC-25 o propranolol atua apenas como antagonista/bloqueador dos β-ARs.

Portanto, os achados laboratoriais do presente estudo indicam que a ativação do β2-AR pela norepinefrina pode afetar negativamente a progressão do câncer de boca, sendo este efeito revertido pelo bloqueio deste receptor. Com base nestes achados sugerimos que o uso local de agonistas dos receptores beta-

adrenérgicos poderia se tornar um alvo terapêutico adjuvante no tratamento desta neoplasia maligna.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir da análise de linhagens de carcinomas espinocelulares de boca, concluímos:

- que houve a expressão do receptor beta 2 adrenérgico em ambas linhagens SCC-9 e SCC-25, sendo esta expressão maior na SCC-25.
- que o estímulo dos β2-ARs, pelo mediador do estresse, a norepinefrina, reduziu a migração e a invasão celular, sendo este efeito revertido pelo antagonista propranolol.

Portanto, nossos resultados sugerem que o uso de agonistas dos receptores beta-adrenérgicos poderia se tornar um alvo terapêutico adjuvante no tratamento do câncer de boca.

Referências

REFERÊNCIAS

ANTONI, M. H. et al. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. **Nat Rev Cancer,** London, v. 6, n. 3, p. 240-8, Mar. 2006.

BERNABÉ, D. G. et al. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. **Brain Behav Immun,** Orlando**,** v. 25, n. 3, p. 574-83, Mar. 2011.

BRAADLAND, P. R. et al. Beta-Adrenergic Receptor Signaling in Prostate Cancer. **Front Oncol,** Lausanne**,** v. 4, p. 375, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** Orlando, v. 72, p. 248-54, May. 1976.

BRAVO-CALDERÓN, D. M. et al. Prognostic significance of beta-2 adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Biomark,** Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 51-9, 2011.

BRUZZONE, A. et al. Dosage-dependent regulation of cell proliferation and adhesion through dual beta2-adrenergic receptor/cAMP signals. **FASEB J,** Bethesda, v. 28, n. 3, p. 1342-54, Mar. 2014.

CARIE, A. E.; SEBTI, S. M. A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway. **Oncogene,** Hampshire, v. 26, n. 26, p. 3777-88, May.

CHOI, C. H. et al. Meta-analysis of the effects of beta blocker on survival time in cancer patients. **J Cancer Res Clin Oncol,** Berlin, v. 140, n. 7, p. 1179-88, Jul. 2014.

CHROUSOS, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. **Ann N Y Acad Sci,** New York, v. 851, p. 311-35, Jun. 1998.

COLE, S. W.; SOOD, A. K. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. **Clin Cancer Res,** Denville, v. 18, n. 5, p. 1201-6, Mar. 2012.

DAAKA, Y.; LUTTRELL, L. M.; LEFKOWITZ, R. J. Switching of the coupling of the beta 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. **Nature,** London, v. 390, n. 6655, p. 88-91, Nov. 1997.

DISTELHORST, C. W. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. **Cell Death Differ,** London, v. 9, n. 1, p. 6-19, Jan. 2002.

GARGIULO, L. et al. Differential beta(2)-adrenergic receptor expression defines the phenotype of non-tumorigenic and malignant human breast cell lines. **Oncotarget,** Albany, v. 5, n. 20, p. 10058-69, Oct. 2014.

GIDRON, Y.; RONSON, A. Psychosocial factors, biological mediators, and cancer prognosis: a new look at an old story. **Curr Opin Oncol,** Philadelphia**,** v. 20, n. 4, p. 386-92, Jul. 2008.

HASEGAWA, H.; SAIKI, I. Psychosocial stress augments tumor development through beta-adrenergic activation in mice. **Jpn J Cancer Res,** Tokyo**,** v. 93, n. 7, p. 729-35, Jul. 2002.

KALINICHENKO, V. V. et al. Norepinephrine-mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta-adrenergic receptor mechanism and decreased TNF-alpha gene expression. **J Immunol,** Bethesda, v. 163, n. 5, p. 2492-9, Sep. 1999.

KANG, F. et al. Propranolol inhibits glucose metabolism and 18F-FDG uptake of breast cancer through posttranscriptional downregulation of hexokinase-2. **J Nucl Med,** Reston, v. 55, n. 3, p. 439-45, Mar. 2014.

LILLBERG, K. et al. Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. **Am J Epidemiol,** Cary, v. 157, n. 5, p. 415-23, Mar. 2003.

LIU, X. et al. Epidermal growth factor-induced esophageal cancer cell proliferation requires transactivation of beta-adrenoceptors. **J Pharmacol Exp Ther,** Baltimore, v. 326, n. 1, p. 69-75, Jul. 2008a.

_____. Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via beta-adrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase/cyclooxygenase-2 pathway. **J Cell Biochem,** New York, v. 105, n. 1, p. 53-60, Sep 1 2008b.

MADDEN, K. S.; SZPUNAR, M. J.; BROWN, E. B. Beta-Adrenergic receptors (beta-AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high beta-AR-expressing breast cancer cell lines. **Breast Cancer Res Treat,** Dordrecht, v. 130, n. 3, p. 747-58, Dec. 2011.

MASUR, K. et al. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. **Cancer Res,** Chicago, v. 61, n. 7, p. 2866-9, Apr. 2001.

METCALFE, C. et al. The role of self-reported stress in the development of breast cancer and prostate cancer: a prospective cohort study of employed males and females with 30 years of follow-up. **Eur J Cancer,** Oxford, v. 43, n. 6, p. 1060-5, Apr. 2007.

MORETTI, S. et al. Beta-adrenoceptors are upregulated in human melanoma and their activation releases pro-tumorigenic cytokines and metalloproteases in melanoma cell lines. **Lab Invest,** New York, v. 93, n. 3, p. 279-90, Mar. 2013.

NICOLAIDES, N. C. et al. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation,** New York, v. 22, n. 1-2, p. 6-19, 2015.

PARK, S. Y. et al. Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1alpha protein-dependent mechanism. **Int J Cancer,** Genève, v. 128, n. 10, p. 2306-16, May. 2011.

PEREZ PIÑERO, C. et al. Involvement of alpha2- and beta2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. **Br J Pharmacol,** London, v. 166, n. 2, p. 721-36, May. 2012.

POWE, D. G. et al. Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. **Oncotarget,** Albany, v. 1, n. 7, p. 628-38, Nov. 2010.

SALAHPOUR, A. et al. Biochemical characterization of beta2-adrenergic receptor dimers and oligomers. **Biol Chem,** Berlin, v. 384, n. 1, p. 117-23, Jan. 2003.

SAUL, A. N. et al. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. **J Natl Cancer Inst,** Cary, v. 97, n. 23, p. 1760-7, Dec. 2005.

SEPHTON, S. E. et al. Depression, cortisol, and suppressed cell-mediated immunity in metastatic breast cancer. **Brain Behav Immun,** Orlando, v. 23, n. 8, p. 1148-55, Nov. 2009.

SHANG, Z. J.; LIU, K.; LIANG DE, F. Expression of beta2-adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med,** Oxford, v. 38, n. 4, p. 371-6, Apr. 2009.

SIVAMANI, R. K. et al. Stress-mediated increases in systemic and local epinephrine impair skin wound healing: potential new indication for beta blockers. **PLoS Med,** San Francisco, v. 6, n. 1, p. e12, Jan. 2009.

SOOD, A. K. et al. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. **Clin Cancer Res,** Denville, v. 12, n. 2, p. 369-75, Jan. 2006.

STEENHUIS, P. et al. Adrenergic signaling in human oral keratinocytes and wound repair. **J Dent Res,** Chicago, v. 90, n. 2, p. 186-92, Feb. 2011.

SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature. **Stress,** Edinburgh, v. 15, n. 5, p. 472-8, Sep. 2012.

THAKER, P. H. et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. **Nat Med,** New York, v. 12, n. 8, p. 939-44, Aug. 2006.

THAKER, P. H.; SOOD, A. K. Neuroendocrine influences on cancer biology. **Semin Cancer Biol,** Philadelphia, v. 18, n. 3, p. 164-70, Jun. 2008.

TOLL, L. et al. {Beta}2-adrenergic receptor agonists inhibit the proliferation of 1321N1 astrocytoma cells. **J Pharmacol Exp Ther,** Baltimore, v. 336, n. 2, p. 524-32, Feb. 2011.

UOTILA, P. The role of cyclic AMP and oxygen intermediates in the inhibition of cellular immunity in cancer. **Cancer Immunol Immunother,** Berlin, v. 43, n. 1, p. 1-9, Sep. 1996.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell,** Cambridge, v. 147, n. 2, p. 275-92, Oct. 2011.

VILARDI, B. M. et al. VEGF-C expression in oral cancer by neurotransmitter-induced activation of beta-adrenergic receptors. **Tumour Biol,** Tokyo, v. 34, n. 1, p. 139-43, Feb. 2013.

WALLUKAT, G. The beta-adrenergic receptors. **Herz,** Munchen, v. 27, n. 7, p. 683-90, Nov. 2002.

WANG, L. P. et al. Norepinephrine attenuates CXCR4 expression and the corresponding invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells via beta2-adrenergic receptors. **Eur Rev Med Pharmacol Sci,** Rome, v. 19, n. 7, p. 1170-81, Apr. 2015.

WNOROWSKI, A. et al. Activation of beta2-adrenergic receptor by (R,R')-4'-methoxy-1-naphthylfenoterol inhibits proliferation and motility of melanoma cells. **Cell Signal,** Oxford, v. 27, n. 5, p. 997-1007, May. 2015.

YANG, E. V. et al. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. **Brain Behav Immun,** Orlando, v. 23, n. 2, p. 267-75, Feb. 2009.

YANG, E. V. et al. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. **Cancer Res,** Hauppauge**,** v. 66, n. 21, p. 10357-64, Nov. 2006.

YU, J. et al. Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer. **Cancer Cell,** Cambridge, v. 12, n. 5, p. 419-31, Nov. 2007.

ZHANG, D. et al. Inhibition of pancreatic cancer cell proliferation by propranolol occurs through apoptosis induction: the study of beta-adrenoceptor antagonist's anticancer effect in pancreatic cancer cell. **Pancreas,** Hagerstown, v. 38, n. 1, p. 94-100, Jan. 2009.

Anexo

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU-USP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Migração e invasão do câncer de boca via ativação de receptor beta 2 adrenérgico por mediador do estresse.

Pesquisador: Diego Mauricio Bravo Calderón

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 14034013.0.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 267.072

Data da Relatoria: 24/04/2013

Apresentação do Projeto:

Recentes evidências têm demonstrado que o estresse crônico, via ativação do receptor beta 2 adrenérgico (ß2-AR) pelas catecolaminas, contribui com a progressão de tumores malignos. Entretanto, foram reportados achados heterogêneos referentes aos efeitos do estresse e seus mediadores sobre as capacidades migratória e invasiva das células neoplásicas, já que estas moléculas podem produzir efeitos estimuladores ou inibidores, dependendo do tipo de tumor. A análise da migração e invasão em linhagens celulares de carcinoma espinocelular de boca, via ativação do ß2-AR por mediador do estresse é importante para contribuir com o esclarecimento da relevância deste receptor no câncer de boca. Duas linhagens de carcinoma espinocelular de boca (SCC-9 e SCC-15) serão analisadas neste estudo. A reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR) e o Western blot serão empregados para analisar e comparar, respectivamente, os níveis de expressão gênica e protéica do ß2-AR nas linhagens SCC-9 e SCC-15.

Objetivo da Pesquisa:

A partir da análise de culturas de células de carcinomas espinocelulares de boca, propôs-se: a) comparar a expressão gênica e protéica do receptor beta 2 adrenérgico (ß2-AR) nas linhagens de CEC de boca, SCC-9 e SCC-15; b) analisar a migração e invasão celular após o estimulo do ß2-AR

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU-USP

Continuação do Parecer: 267.072

com diferentes concentrações de norepinefrina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, nem benefícios a serem analisados, pois trata-se de estudo com arquivo de cultura de células do Banco de Células do Rio de Janeiro-Associação Técnico Científica Paul Ehrlich,Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa envolvendo estudo com cultura de células com o objetivo de comparar a expressão gênica e proteica do receptor beta 2 adrenérgico nas linhagens de câncer espinocelular de boca e analisar a migração e invasão celular após o estímulo desse receptor com diferentes concentrações de norepinefrina.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Toda a documentação necessária para a avaliação dos preceitos éticos desse projeto foram devidamente apresentados, incluindo folha de rosto assinada pelo responsável pela instituição, orçamento financeiro detalhado, cronograma, autorização dos responsáveis para uso das culturas de células, critérios para suspender ou encerrar a pesquisa, declaração de publicação dos resultados e currículo Lattes de todos os participantes da pesquisa.

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todos os documentos necessários foram devidamente anexados e permitiram a apreciação ética do projeto. considerando que não há impedimentos éticos para sua realização, sou de parecer favorável à aprovação desse projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata, por unanimidade, o parecer APROVADO emitido pelo relator em reunião de 24.4.2013. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU-USP

Continuação do Parecer: 267.072

informações que sejam significativas deverão ser prontamente comunicadas a este CEP. Na apresentação do relatório final, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação pertinentes assinados e rubricados.

BAURU, 09 de Maio de 2013

Assinador por:
Maria Teresa Atta
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br