UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

BRUNA MARIA RODRIGUES VILARDI

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VEGF-C POR MEDIADOR
RELACIONADO AO ESTRESSE EM CULTURAS DE CARCINOMAS
ESPINOCELULARES DE BOCA**

BAURU
2011

BRUNA MARIA RODRIGUES VILARDI

Modulação da expressão de VEGF-C por mediador relacionado ao estresse em culturas de carcinomas espinocelulares de boca

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Patologia Bucal.
Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira
Versão corrigida.

BAURU
2011

V71m Vilardi, Bruna Maria Rodrigues
Modulação da expressão de VEGF-C por
mediador relacionado ao estresse em culturas de
carcinomas espinocelulares de boca/ Bruna Maria
Rodrigues Vilardi. – Bauru, 2011.

89p. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

A versão original encontra-se disponível na unidade que aloja
o programa.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Faculdade
de Odontologia de Bauru-Universidade de São Paulo
Protocolo nº: 068/10
Data: 28 de Maio de 2010.

DADOS CURRICULARES

Bruna Maria Rodrigues Vilarde

10/06/1981	Nascimento na cidade de Lins-SP
2002 – 2006	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Lins - Universidade Metodista de Piracicaba
2006 – 2007	Atuação como cirurgiã-dentista atendendo em clínica geral e avaliações estomatológicas.
2008 – 2009	Atuação como cirurgiã-dentista atendendo em clínica geral, prótese e avaliações estomatológicas na L.K.L Plano Odontológico LTDA.– SP.
2006 – 2007	Participação do grupo de pesquisa de doenças psicossomática em odontologia.
2009 – 2011	Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de Concentração: Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação aos portadores de câncer que são o motivo
do meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por me dar a vida, me amar incondicionalmente, me cobrir de bênçãos, por me dar minha amada família e a oportunidade de realizar meu sonho e cursar o mestrado na Instituição que almejei.

À minha mãe **Sandra Vilardi** e ao meu pai **Sebastião Vilardi**

Por terem me amado mesmo antes de eu nascer, por me darem um bom alicerce familiar, por estarem ao meu lado em todos os momentos, por me passarem todos os ensinamentos, inclusive, ter princípios e o valor da família. Obrigada pela constante paciência, por acreditarem e investirem em mim, por me amarem sob qualquer condição. São infinitos agradecimentos, amo vocês.

À minha irmã, **Taisa Vilardi**

Por ser minha companheira de todas as horas, amiga fiel, me ajudar sem nem mesmo ser solicitada, me cuidar, me dar força e me divertir. Obrigada pelo ombro a ombro em qualquer situação e sempre, por abrir mão das coisas para me beneficiar, pelas diversas lições e pela paciência.

À minha irmã, **Larissa Vilardi**

Por sempre me ajudar, por me ensinar tanto, por me dar verdadeiras lições de vida, por trazer à tona o melhor amor que tenho.

À minha avó **Dirce Bacaro Granado Rodrigues**

A matriarca mais maravilhosa, inteligente, linda, meu porto seguro, obrigada por ser a avó mais presente, amiga, companheira, sábia e conselheira. Obrigada por me amar desde sempre e em qualquer momento.

A meu anjo amado **Luiz Vinicius Morelli**

Por ser um homem idôneo e correto, inteligente, companheiro dedicado e doce, respeitador, sábio, centrado, por se dedicar a mim com imenso amor, por ser um anjo de Deus em minha vida, por me compreender, por ser meu amigo, por me ajudar de todas as formas possíveis, por me ensinar tantas coisas, por me incentivar em toda e qualquer escolha e fazer de tudo para torná-las viáveis, obrigada por ter muita paciência comigo.

À minha madrinha **Mara Rúbia Rodrigues Quintella** e ao tio **Walter Quintella**

Por todo apoio, carinho, cuidados, e especialmente a minha madrinha que sempre foi minha amiga, confidente e companheira durante toda a minha vida,

À minha orientadora, **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**

Por me dar a honra de ser sua orientada, por confiar e me dar a chance de desenvolver esta pesquisa, por me respeitar, por me ensinar o máximo possível da patologia com extrema dedicação e alegria, pela paciência durante esses anos, e principalmente pela amizade.

A meus animais de estimação **Maria Clara, Maria Eugênia e Nega**

Por me amarem incondicionalmente, por me proporcionar só momentos de alegrias, pelas brincadeiras que me relaxavam e divertiam, por todo carinho.

À minha orientadora da graduação **Professora Doutora Nancy Alfieri Nunes**

*Por me ajudar a melhorar na minha vida espiritual e emocional, pelo amor e amizade, por tudo que me ensinou de odontologia e estomatologia, por me fazer uma cirurgiã-dentista, pelas oportunidades que me proporcionou todos esses anos, inclusive a de realizar meu sonho de mestrado na instituição que almejei. Agradeço muito por fazer tudo que estivesse ao seu alcance para melhorar minha vida e me melhorar como pessoa, tudo que recebi é imensurável. Obrigada a toda família **Alfieri Nunes**, pessoas que tenho grande amor e apreço: Professor Dr. Benoni, Sarah, Vânia e Davison.*

À família **Back Travi e Felicio: Mônica Back, Mario Felicio, Alexadre Back Travi, Aimê Back Felicio**

Pela amizade, pelos cuidados, por me acolherem generosamente, pelo carinho, pelos momentos em família, por momentos de diversão e alegria.

À família **Oliveira: Lurdes, Marcio, Bruno e Aline**

Por me acolher, por serem tão generosos, pelo carinho e amor, por toda atenção, cuidados e pela amizade.

Aos meus amigos **Alexandre Back Travi, Aimê Back Felício, Aline Oliveira, Bruno Oliveira, Maurício Spin e Sarah Miquelão**

Por toda amizade, apoio e diversão.

Aos meus colaboradores, **Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira e Dr. Daniel Galera Bernabé**

Por me passarem toda carga de conhecimentos que possuíam de forma dedicada e paciente. Agradeço também pelo carinho e amizade.

Aos professores da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru,
Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira,
Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira e Profa. Dra. Vanessa Soares Lara
pelos ensinamentos, respeito e amizade ao longo desses anos.

As funcionárias da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru,
Maria Cristina Carrara Felipe e Fátima Aparecida Silveira por fazer esses
dois anos no Departamento ser uma experiência de aprendizagem, amizade,
carinho e respeito.

Aos meus amigos e colegas que surgiram durante o curso de pós-graduação,
Adriana dos Santos Caetano, Ana Regina Casaroto, Alexandre Garcia, Aroldo
dos Santos Almeida, Bruno Aiello Barbosa, Carine Ervolino de Oliveira,
Cristiane Carvalho, Diego Maurício Bravo Calderón, Eloisa Marchi dos Anjos,
Érika Martins Pereira, Fernanda Mombrini Pigatti, Heliton Gustavo de Lima,
Karen Henriette Pinke, Kellen Cristina Tjioe, Maria Carolina Vaz Goulart, Maria
Carolina Martins Mussi, Mariana Rates, Natália Galvão, Patrícia Freitas-Faria,
Priscila Lie Toubouti, Ronald Ordinola Zapata, Samira Salmeron, Simone Eloiza
Sita Faustino, Sylvie Brener e Thais Priscila Biassi.

Ao meu amigo **Diego Maurício Bravo Calderón**

Por toda ajuda e colaboração, obrigada por ser meu irmão equatoriano,
companheiro e amigo dedicado.

À minha amada amiga **Maria Carolina Vaz Goulart**

Pelas trocas de experiências, apoio, preocupação, ensinamentos e amizade
no melhor estilo mineiro.

A **todos os funcionários da Secretaria de Pós-graduação** da Faculdade de
Odontologia de Bauru.

A **todos os funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Aos funcionários do **Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.**

Aos meus amigos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP: **Aline Satie Takamiya, Ariane Cristina Araújo dos Santos, Caril Constante Ferreira do Amaral, Jean Carlos Soares Borges dos Santos, Luis César Farias de Oliveira, Rafael Simões Gonçalves, Leonardo Belini, Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes, Vanessa Aparecida Carvalho Santos, Fabiano Silberschmidt, Gean Domingos, Taís Danilucci, Antônio Hernandez e Natália Manrique.** Por serem receptivos, por estarem sempre me ajudando e por me tratarem com carinho.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa do seu diretor, **Prof. Dr. José Carlos Pereira.**

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa de seu presidente, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.**

Ao Curso de Pós-graduação na Área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa da sua coordenadora, **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira.**

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Básicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), na pessoa da **Profa.Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira .**

À CAPES, pelo auxílio pecuniário.

À FAPESP, pelo auxílio à pesquisa (Processo 2010/06333-3)

Ao CNPq, pelo auxílio à pesquisa (Processo CNPq 476139/2010-4).

RESUMO

Os mediadores do estresse, epinefrina e norepinefrina, participam da modulação de diversos processos celulares como a proliferação, a migração celular e a apoptose durante a tumorigênese, influenciando assim, o crescimento e a progressão tumoral. A presença de receptores beta-adrenérgicos e sua expressiva resposta ao estímulo do neurohormônio norepinefrina foram identificadas em várias linhagens de células tumorais, incluindo o carcinoma espinocelular de boca. O objetivo deste estudo foi investigar a influência da norepinefrina na expressão do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C (VEGF-C) em cultura de células de carcinoma espinocelular de boca que continham receptores beta adrenérgicos. As linhagens celulares (SCC-9 e SCC-25) foram estimuladas com norepinefrina em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 μ M) e com 1 μ M de propranolol, sendo analisadas após 1, 6 e 24 horas. A expressão gênica e proteica de VEGF-C foram avaliadas, respectivamente, por RT-PCR em tempo real e por ELISA. A produção de RNAm para VEGF-C teve um comportamento irregular, com tendências a variações da expressão gênica (aumento e inibição). A dosagem proteica nos sobrenadantes das culturas de células malignas não refletiu a expressão gênica de VEGF-C. Somente na linhagem SCC-25 ocorreu uma inibição significativa da produção de VEGF-C ($p < 0,001$) pelas células neoplásicas no ensaio de 24 horas após o estímulo com 10 μ M de norepinefrina. Estes resultados sugerem que a expressão de VEGF-C nas linhagens de carcinomas espinocelulares humanos de boca, parece não ser mediado pela norepinefrina, via receptores beta-adrenérgicos.

Palavras-chave: Câncer bucal, Receptores beta-adrenérgicos, Fator C de crescimento endotelial vascular, Estresse.

ABSTRACT

Modulation of VEGF-C expression by stress related mediator in oral squamous cell carcinoma cell lines

The mediators of stress, epinephrine and norepinephrine, are involved in modulation of many cellular processes such as proliferation, migration and apoptosis influencing the tumor growth and progression. The presence of beta-adrenergic receptors and their significant response to stimulation of neurohormone norepinephrine has been identified in various tumor cell lines, including oral squamous cell carcinoma. The aim of this study was to investigate the influence of norepinephrine on the expression of vascular endothelial growth factor type C (VEGF-C) in oral squamous carcinomas cell lines that contained beta-adrenergic receptors. Cell lines (SCC-9 and SCC-25) were stimulated with different concentrations of norepinephrine (0.1, 1 and 10 mM) and 1 μ M of propranolol, and analyzed after 1, 6 and 24 hours. Gene and protein expressions of VEGF-C were evaluated, respectively, by real time PCR and by ELISA. The results showed an irregular behavior of the oral squamous carcinoma cell lines, with trends to increase or to inhibit the VEGF-C gene expression. Dosage protein in supernatant cultures of malignant cells did not reflect the gene expression of VEGF-C. Only in the SCC-25 cell line was detected a significant inhibition of VEGF-C production by neoplastic cells, twenty-four hours after stimulation with 10 μ M norepinephrine ($p < 0,001$). These results suggest that VEGF-C expression in oral squamous carcinomas cell lines seems not to be mediated by norepinephrine through the beta adrenergic receptor pathway.

Keywords: Oral cancer, beta adrenergic receptors, VEGF-C, Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) uma hora após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo)..... 54
- Gráfico 2 - Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P=propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo)..... 55
- Gráfico 3 - Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P=propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo)..... 56
- Gráfico 4 - Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) uma hora após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo)..... 57
- Gráfico 5 - Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não tratadas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo)..... 58
- Gráfico 6 - Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo)..... 58

Gráfico 7 -	Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) uma hora após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).....	60
Gráfico 8 -	Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).....	61
Gráfico 9 -	Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo),* indica diferença estatística em comparação ao controle (p<0,001).....	62
Gráfico 10 -	Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) uma hora após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo),* indica diferença estatística em comparação ao controle (p<0,01).....	63
Gráfico 11 -	Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).....	64
Gráfico 12 -	Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).....	64

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C	Grau Celsius
β-ARs	Receptores beta adrenérgicos
β1-AR	Receptores beta adrenérgicos tipo 1
β2-AR	Receptores beta adrenérgicos tipo 2
μl	Microlitro
μM	Micromolar
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX-2	Ciclooxigenase 2
DMEM	Meio de <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco's</i>
DMEM/F12	Meio de <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco's</i> com adição de meio de cultura F12
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Erk 1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated MAP Kinases 1/2</i> (MAP Quinases Reguladas por Sinal Extracelular 1/2)
FLT-4	Receptor Para o Fator de crescimento endotelial vascular do tipo 3
HIF-1α	<i>Hypoxia-inducible Factor-1α</i> (Fator 1α Induzível por Hipóxia)
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MIA	Fator de Atividade Inibitória de Melanoma
MMP-2	Metaloproteinases da matriz 2
MMP-9	Metaloproteinases da matriz 9
nm	Nanômetro
<i>p</i>	Valor de teste estatístico
PKA	Proteína quinase A
qPCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico

RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAse	Ribonuclease
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SCC-9	Células de carcinoma espinocelular de boca humano, linhagem 9
SCC-15	Células de carcinoma espinocelular de boca humano, linhagem 15
SCC-25	Células de carcinoma espinocelular de boca humano, linhagem 25
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	Silenciador de expressão de gene
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular do tipo A
VEGF-B	Fator de crescimento endotelial vascular do tipo B
VEGF-C	Fator de crescimento endotelial vascular tipo C
VEGF-D	Fator de crescimento endotelial vascular tipo D
VEGFR-1	Receptor para o Fator de crescimento endotelial vascular do tipo 1
VEGFR-2	Receptor para o Fator de crescimento endotelial vascular do tipo 2
VEGFR-3	Receptor Para o Fator de crescimento endotelial vascular do tipo 3
VEGFs	Fatores de crescimento endotelial vascular
x.g	Rotações

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	NEUROHORMÔNIOS DO ESTRESSE E CÂNCER	29
2.2	NEUROHORMÔNIOS DO ESTRESSE E FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)	32
2.3	FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR DO TIPO C (VEGF-C) E CÂNCER DE BOCA	37
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	CULTURA DE CÉLULAS	47
4.2	ESTÍMULOS DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS COM NOREPINEFRINA E PROPRANOLOL	47
4.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO VEGF-C POR REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE COM TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL (qPCR)	48
4.3.1	Extração de RNA	48
4.3.2	Síntese de DNA complementar (cDNA)	48
4.3.3	Quantificação de RNAm para VEGF-C	49
4.4	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE VEGF-C NO SOBRENADANTE CELULAR POR ELISA	49
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50

4.6	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	50
5	RESULTADOS	51
5.1	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)	53
5.1.1	Carcinoma espinocelular humano de boca – linhagem SCC-9	54
5.1.2	Carcinoma espinocelular humano de boca – linhagem SCC-25	56
5.1.3	Comparações da expressão de VEGF-C nas linhagens SCC-9 e SCC-25	59
5.2	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	60
5.2.1	Carcinoma espinocelular humano de boca – linhagem SCC-9	60
5.2.2	Carcinoma espinocelular humano de boca – linhagem SCC-25	62
5.2.3	Comparações da expressão de VEGF-C nas linhagens SCC-9 e SCC-25	65
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO	87

1 - Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a ação das catecolaminas epinefrina e norepinefrina, mediadas pelos receptores adrenérgicos, tem sido investigada na tumorigênese. (HASEGAWA; SAIKI, 2002; REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004; ANTONI, et al., 2006; SOOD et al., 2006; YANG et al., 2006; FLINT et al., 2007; CHAN; LIN; LIN., 2008; LIU et al., 2008; ARMAIZ-PENA et al., 2009; YANG et al., 2009; YAO et al., 2009).

Foi demonstrado que quando ativados por catecolaminas, os receptores beta-adrenérgicos, estimulam a adenilciclase produzindo AMP cíclico (AMPc) que ativa a via da proteína kinase A (PKA) e dessa forma, modulam inúmeros processos celulares como a proliferação, a migração celular e a apoptose, influenciando o crescimento e a progressão tumoral (MASUR et al., 2001; SCHULLER, 2007; FITZGERALD, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009; BERNABÉ et al., 2011). Entretanto, o significado biológico das catecolaminas relacionados ao estresse e seus mecanismos patogênicos no câncer humano ainda são pobremente compreendidos (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004; ANTONI, et al., 2006; THAKER et al., 2006).

A presença de receptores beta-adrenérgicos (β -ARs) e sua expressiva resposta ao estímulo da norepinefrina foram identificadas em várias linhagens de células tumorais (FREDRIKSSON et al., 2000; MASUR et al., 2001; LUTGENDORF et al., 2003; THAKER et al., 2006; YANG et al., 2006; YANG et al., 2008; GUO et al., 2009), incluindo o carcinoma espinocelular de boca (SHANG; LIU; LIANG, 2009).

Recentemente, Bernabé et al., em 2011 demonstraram, *in vitro*, as primeiras evidências de que fatores neurohormonais relacionados ao estresse podem influenciar o comportamento biológico do câncer de boca. Os autores avaliaram os efeitos dos hormônios relacionados ao estresse (norepinefrina e cortisol) sobre a expressão de IL-6 e a proliferação celular em linhagens de carcinomas espinocelulares bucais, que continham constitutivamente receptores beta-adrenérgicos (β -ARs). Os estímulos com norepinefrina e isoproterenol resultaram em aumento da expressão de RNAm e da produção de IL-6 pelas células malignas. Os efeitos na expressão de IL-6 foram bloqueados pelo propranolol um

antagonista inespecífico dos receptores β adrenérgicos. As doses hormonais que simulavam condições de estresse (10 μ M) induziram um aumento da proliferação celular e houve uma tendência do estímulo com cortisol aumentar a expressão de IL-6 nas células malignas. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que a proliferação celular dos carcinomas espinocelulares de boca pode ser influenciada pelos hormônios do estresse, por meio da atuação nos receptores beta adrenérgicos.

Mesmo com os resultados de estudos *in vitro* como os descritos anteriormente, os mecanismos pelos quais os neurohormônios influenciam o crescimento e as progressões do câncer humano necessitam ser investigados mais profundamente (HASEGAWA, SAIKI, 2002; REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004; ANTONI et al., 2006; SOOD et al., 2006; YANG et al., 2006; FLINT et al., 2007; CHAN; LIN; LIN, 2008; LIU et al., 2008; ARMAIZ-PENA et al., 2009; YANG et al., 2009; YAO et al., 2009).

Um aspecto interessante relacionado à ação dos mediadores do estresse na carcinogênese foi descrito por Lutgendorf e colaboradores em 2003 ao demonstrarem que a produção do fator de crescimento VEGF foi diretamente aumentada por norepinefrina, epinefrina e cortisol em linhagens de células neoplásicas de ovário que apresentavam receptores beta-adrenérgicos. Outros estudos em neoplasias malignas de nasofaringe (YANG et al., 2006), de ovário (THAKER et al., 2006), em mieloma múltiplo (YANG et al., 2008), em melanoma (YANG et al., 2009) e em câncer pancreático (GUO et al., 2009) também demonstraram que a norepinefrina aumenta a expressão de VEGF atuando nos receptores beta adrenérgico.

Os membros da família VEGF, são reguladores centrais da angiogênese e linfangiogênese tumoral e tem sido correlacionados com a ocorrência de metástases por meio da invasão de células malignas tanto nos vasos sanguíneos como nos linfáticos (O-CHAROENRAT; RHYS-EVANS; ECCLES, 2001; ACHEN; MANN; STACKER, 2006; NAKAZATO et al., 2006; HIRAKAWA et al., 2007; SU et al., 2007; WARBURTON et al., 2007; ACHEN; STACKER, 2008; BOCK et al., 2008; DAS; SKOBE, 2008; SIRIWARDENA et al., 2008; MATSUURA et al., 2009; SUGIURA et al., 2009).

Nos tumores sólidos malignos da região de cabeça e pescoço, como o carcinoma espinocelular, os membros da família VEGF, especialmente VEGF-C e

VEGF-D, tem sido associados à formação de novos vasos linfáticos e a dilatação dos pré-existentes ao atuarem sobre o receptor VEGFR-3, presente no endotélio linfático (NEUCHRIST et al., 2003; LI et al., 2006; WARBURTON et al., 2007). Assim sendo, tem sido mostrada uma forte associação do VEGF-C com a ocorrência de metástase linfonodal e consequentemente com a progressão tumoral (O-CHAROENRAT; RHYS-EVANS; ECCLES, 2001; NEUCHRIST et al., 2003; LI et al., 2006; NAKAZATO et al., 2006; WARBURTON et al., 2007; SIRIWARDENA et al., 2008; SUGIURA et al., 2009), influenciando diretamente o prognóstico do paciente (PIMENTA AMARAL et al., 2004; BOCK et al., 2008).

De acordo com esta revisão de literatura, ficou comprovado que os neurohormônios como norepinefrina, epinefrina e cortisol aumentam *in vitro* a expressão do fator de crescimento VEGF em células malignas. Portanto, a investigação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C em células malignas estimuladas com norepinefrina, como proposto no presente estudo, poderá contribuir para o entendimento da via de sinalização ativada por este mediador do estresse nas células dos carcinomas espinocelulares de boca.

2 – Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEUROHORMÔNIOS DO ESTRESSE E CÂNCER

O estresse é definido como um estado em que ocorreu um desequilíbrio na homeostasia (CHROUSOS; GOLD, 1992). Frente ao estímulo estressor o organismo desencadeia o chamado sistema do estresse, que implica em respostas via sistema nervoso central, órgãos periféricos e tecidos. A intensidade e tempo de duração das condições estabelecidas pelo sistema do estresse podem culminar em diversas patologias (CHROUSOS; GOLD, 1992; CHROUSOS, 2009).

O estresse emocional leva a ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) e aumenta a produção de epinefrina e norepinefrina, conhecidas como catecolaminas (CHROUSOS; GOLD, 1992; HASEGAWA; SAIKI, 2002; REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004; SCHULLER, 2008; ARMAIZ-PENA et al., 2009; CHROUSOS, 2009; SHERMAN et al., 2009).

A ação das catecolaminas nas células, normalmente, é mediada pelos receptores adrenérgicos β (β -ARs) divididos em três grupos: β 1, β 2 e β 3 que podem ser encontrados, respectivamente, em músculos respiratório, cardíaco e tecido adiposo (DAAKA; LUTTRELL; LEFKOWITZ, 1997; JOHNSON, 2006). Quando ativados, os receptores adrenérgicos estimulam a adenililciclase que produz AMP cíclico (AMPC) ativando a via da proteína quinase A (DAAKA; LUTTRELL; LEFKOWITZ, 1997). Assim, em células neoplásicas, o estímulo dos receptores β adrenérgicos por meio das catecolaminas modulam inúmeros processos como a proliferação, a migração celular, a apoptose, a angiogênese e o crescimento tumoral (MASUR et al., 2001; SCHULLER, 2007; FITZGERALD, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009; BERNABÉ et al., 2011).

Recentes evidências suportam a hipótese que o estresse crônico pode influenciar o crescimento e a progressão tumoral. Alguns estudos, *in vitro*, utilizando diferentes linhagens celulares neoplásicas, têm investigado as respostas celulares,

via ativação dos receptores beta adrenérgicos, pelas catecolaminas (SHANG; LIU; LIANG, 2009; ZHANG et al., 2009; SHAHZAD et al., 2010; BERNABÉ et al., 2011).

Shang, Liu e Liang (2009) examinaram a correlação entre o receptor beta adrenérgico do tipo 2 (β 2-AR) e a proliferação e migração de linhagens de carcinoma espinocelular de boca. Por meio de RT-qPCR demonstraram a expressão do RNAm do β 2-AR e com *Western blot* comprovaram a produção desses receptores. Sequencialmente, estimularam as células com norepinefrina induzindo a mitose e a migração das células neoplásicas através de barreiras membranosas sintéticas, efeitos totalmente inibidos pelo propranolol. Desta forma, evidenciaram que a norepinefrina, via β 2-AR, estimulou a proliferação e a migração celular. Empregaram também a técnica imunohistoquímica e avaliaram a expressão do β 2-AR em 65 carcinomas espinocelulares de boca de pacientes sem tratamento prévio. A avaliação revelou que 67,7% dos tumores apresentaram marcações citoplasmática e membranosa para β 2-AR. Mostraram ainda, que a expressão de β 2-AR, foi significativamente correlacionada com a metástase linfonodal, tamanho do tumor e estágio clínico. A partir desses dados os autores concluíram que a interação da norepinefrina com β 2-AR pode mediar a proliferação e migração das células tumorais tendo uma importante participação no desenvolvimento da metástase linfonodal do carcinoma espinocelular de boca.

Em culturas de células de adenocarcinoma de pâncreas, ainda em 2009, Zhang e colaboradores mostraram, por meio de RT-qPCR e *Western blot*, a expressão de β 1-AR e β 2-AR. Ao estimularem as células neoplásicas com epinefrina houve um aumento da proliferação celular. Estimularam as células do adenocarcinoma de pâncreas com propranolol, metoprolol, butoxamine e, por meio de Western Blot, demonstraram aumento nas caspases 3 e caspases 9 e aumento de apoptose induzida por propranolol. Os autores concluíram que os antagonistas β -ARs, ao induzir atividades das caspases 3 e 9 levaram ao aumento de apoptose em adenocarcinomas pancreáticos, e sugeriram que os antagonistas β -ARs são alvos promissores no tratamento dessa patologia.

Também Shahzad et al. (2010), avaliaram os efeitos das catecolaminas sobre o crescimento tumoral em duas linhagens celulares de câncer de ovário. As culturas celulares foram estimuladas com norepinefrina e epinefrina para observar a expressão de interleucina 8 (IL-8). Utilizando ensaio imunoenzimático ELISA e qPCR notaram que, na presença de norepinefrina e epinefrina houve um aumento de

via ativação dos receptores beta adrenérgicos, pelas catecolaminas (SHANG; LIU; LIANG, 2009; ZHANG et al., 2009; SHAHZAD et al., 2010; BERNABÉ et al., 2011).

Shang, Liu e Liang (2009) examinaram a correlação entre o receptor beta adrenérgico do tipo 2 (β 2-AR) e a proliferação e migração de linhagens de carcinoma espinocelular de boca. Por meio de RT-qPCR demonstraram a expressão do RNAm do β 2-AR e com *Western blot* comprovaram a produção desses receptores. Sequencialmente, estimularam as células com norepinefrina induzindo a mitose e a migração das células neoplásicas através de barreiras membranosas sintéticas, efeitos totalmente inibidos pelo propranolol. Desta forma, evidenciaram que a norepinefrina, via β 2-AR, estimulou a proliferação e a migração celular. Empregaram também a técnica imunohistoquímica e avaliaram a expressão do β 2-AR em 65 carcinomas espinocelulares de boca de pacientes sem tratamento prévio. A avaliação revelou que 67,7% dos tumores apresentaram marcações citoplasmática e membranosa para β 2-AR. Mostraram ainda, que a expressão de β 2-AR, foi significativamente correlacionada com a metástase linfonodal, tamanho do tumor e estágio clínico. A partir desses dados os autores concluíram que a interação da norepinefrina com β 2-AR pode mediar a proliferação e migração das células tumorais tendo uma importante participação no desenvolvimento da metástase linfonodal do carcinoma espinocelular de boca.

Em culturas de células de adenocarcinoma de pâncreas, ainda em 2009, Zhang e colaboradores mostraram, por meio de RT-qPCR e *Western blot*, a expressão de β 1-AR e β 2-AR. Ao estimularem as células neoplásicas com epinefrina houve um aumento da proliferação celular. Estimularam as células do adenocarcinoma de pâncreas com propranolol, metoprolol, butoxamine e, por meio de Western Blot, demonstraram aumento nas caspases 3 e caspases 9 e aumento de apoptose induzida por propranolol. Os autores concluíram que os antagonistas β -ARs, ao induzir atividades das caspases 3 e 9 levaram ao aumento de apoptose em adenocarcinomas pancreáticos, e sugeriram que os antagonistas β -ARs são alvos promissores no tratamento dessa patologia.

Também Shahzad et al. (2010), avaliaram os efeitos das catecolaminas sobre o crescimento tumoral em duas linhagens celulares de câncer de ovário. As culturas celulares foram estimuladas com norepinefrina e epinefrina para observar a expressão de interleucina 8 (IL-8). Utilizando ensaio imunoenzimático ELISA e qPCR notaram que, na presença de norepinefrina e epinefrina houve um aumento de

interleucina 8 porém, o estímulo prévio de propranolol bloqueou o aumento da citocina, provando o envolvimento dos β -ARs nessa via de sinalização. Nas culturas celulares, o forskolin levou ao aumento de IL-8, o tratamento com ativador de proteína quinase C não alterou essa expressão e o bloqueador específico proteína quinase A inibiu totalmente IL-8, evidenciando a ligação β -ARs--AMPc/PKA--IL-8. Em modelos animais foram implantadas células de câncer de ovário e os ratos expostos ao estresse apresentaram aumento da norepinefrina e um maior crescimento tumoral. Entretanto, nos animais com os genes IL-8 silenciado, mesmo com o aumento de norepinefrina não houve crescimento tumoral. Observaram ainda, linfonodos e metástases em animais estressados e animais silenciados mostrando que, o grupo estressado tinha aumento de linfonodos e nos animais silenciados para IL-8, os linfonodos foram reduzidos. Ratos estressados apresentaram um aumento de IL-8 e de metástases, contrariamente, em animais silenciados a metástase foi completamente inibida. O índice de proliferação celular foi reduzido tanto nos animais estressados, quanto naqueles silenciados para IL-8. O efeito angiogênico do estresse no ambiente tumoral foi investigado baseado na densidade microvascular. Nos ratos etressados, a densidade microvascular foi maior do que nos grupos controle e silenciados para IL-8. Este estudo concluiu que o estresse aumenta a IL-8 influenciando o aumento de metástase e o crescimento tumoral.

Uma das primeiras evidências de que as catecolaminas influenciam o comportamento biológico do câncer de boca foi demonstrado no estudo de Bernabé e colaboradores em 2011. Os pesquisadores verificaram os efeitos da norepinefrina e do cortisol na expressão de IL-6 e na proliferação celular em culturas de carcinomas espinocelulares de boca (SCC-9, SCC-15 e SCC-25). Por meio de qPCR observaram que todas as linhagens celulares expressaram os receptores beta adrenérgicos do tipo 1 e do tipo 2. Mostraram que o estímulo com a norepinefrina, principalmente em concentrações equivalente ao estresse, aumentou a expressão gênica e proteica de IL-6. As doses hormonais, de cortisol e norepinefrina, compatíveis com o estresse fisiológico aumentaram o índice de proliferação celular. Os autores concluíram que os mediadores relacionados ao estresse, via receptores beta adrenérgicos, podem aumentar a produção da IL-6 e induzir a proliferação de células neoplásica, influenciando assim, o comportamento de carcinoma espinocelulares de boca.

Embora muitos estudos tenham demonstrado que as catecolaminas relacionadas ao estresse afetam o desenvolvimento tumoral e a ocorrência de metástases, o efeito oposto dos mediadores do estresse nas células neoplásicas também tem sido descrito.

Carie e Sebti (2007) ao estimular as linhagens celulares de adenocarcinoma de mama com agonista do β 2-AR notaram aumento de AMPc e inibição na formação de Erk1/2. Determinaram que o estímulo do β 2-AR induziu a formação de AMPc ativando PKA que inibiu a via de sinalização de Erk1/2. A inibição desta via reduziu o crescimento celular e aumentou a apoptose, contribuindo assim para a regressão tumoral. Entretanto, estes resultados não foram confirmados em linhagens celulares neoplásicas de cólon e pulmão. Os autores sugeriram que o estímulo dos β 2-ARs pode inibir a tumorigênese em neoplasias cujas células expressam estes receptores.

2.2 NEUROHORMÔNIOS DO ESTRESSE E FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

As catecolaminas podem afetar o crescimento e a vascularização tumoral. Dependendo do neurotransmissor e do tipo de tumor esses efeitos podem ser tanto estimuladores, quanto inibidores. Norepinefrina e epinefrina são potentes estimuladores da vascularização atuando, ambos, na indução da liberação de fatores angiogênicos das células tumorais ou diretamente na função das células endoteliais (TILAN; KITLINSKA, 2010).

A relação dos mediadores do estresse com a angiogênese tumoral tem sido investigada, principalmente, com base na atividade do fator de crescimento endotelial vascular do tipo A (FREDRIKSSON et al., 2000; LUTGENDORF et al., 2003; THAKER et al., 2006; YANG et al., 2006; YANG et al., 2008; GUO et al., 2009; YANG et al., 2009; PARK et al., 2011)

Os membros da família VEGF são reguladores centrais da angiogênese e linfangiogênese tumoral e tem sido correlacionado com a ocorrência de metástases por meio da invasão de células malignas tanto nos vasos sanguíneos como nos linfáticos (NICOSIA, 1998; O-CHAROENRAT; RHYS-EVANS; ECCLES, 2001; ACHEN; MANN; STACKER, 2006; NAKAZATO et al., 2006; HIRAKAWA et al., 2007; SU et al., 2007; Warburton et al., 2007; ACHEN; STACKER, 2008; BOCK et al.,

2008; DAS; SKOBE, 2008; SIRIWARDENA et al., 2008; MATSUURA et al., 2009; SUGIURA et al., 2009).

Em adipócitos marrons normais de ratos, Asano, Irie e Saito em 2001, avaliaram a expressão gênica dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) do tipo A, B e C por meio de *Northern blot*. As linhagens celulares foram cultivadas em dois momentos, como pré adipócitos e após a diferenciação celular em adipócitos. Em ambos os casos, a produção de RNAm para VEGF (do tipo A), VEGF-B, VEGF-C foram mensurados. Observaram que os pré adipócitos expressavam VEGF, VEGF-B e VEGF-C, entretanto, a menor expressão foi de VEGF. Notaram, também, que após a diferenciação celular, os adipócitos não mostraram alteração na expressão de VEGF-B e VEGF-C, no entanto, houve um aumento na expressão de RNAm para VEGF-A. Em seguida, estimularam os pré adipócitos com 1 μ M de norepinefrina e houve aumento da expressão de VEGF e diminuição de VEGF-C. No ensaio de estímulo dos pré adipócitos com 10 μ M de norepinefrina houve um aumento na expressão do gene de VEGF-A. Em adipócitos diferenciados o tratamento com 10 μ M de norepinefrina levou a diminuição da expressão de RNAm para VEGF-C. Os ensaios *in vitro* mostraram que, a norepinefrina aumentou a expressão de gene VEGF independente da diferenciação das células. Entretanto, a expressão gênica de VEGF-C com o estímulo da norepinefrina foi inibida independente da diferenciação celular dos adipócitos. Os autores sugeriram que a inibição de VEGF-C pode diminuir angiogênese e que os mecanismos adrenérgicos responsáveis pelo aumento da expressão de VEGF são diferentes daqueles que modulam a expressão de VEGF-C.

Lutgendorf e colaboradores (2003) pesquisaram, em linhagens celulares de câncer de ovário, a influência da norepinefrina, epinefrina e cortisol na progressão tumoral. Foi constatado nas linhagens, por meio de RT-qPCR, a presença dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 . Ao estimularem as culturas celulares com norepinefrina, epinefrina e isoproterenol verificaram, por meio de ELISA, o aumento da expressão de VEGF, sendo este efeito maior com norepinefrina e inibido pelo propanolol. Quando a cultura celular foi estimulada com cortisol ocorreram expressões variadas de VEGF com aumento ou diminuição dos níveis deste fator de crescimento. Os autores sugeriram que os mediadores do estresse agem sobre os β ARs modulando a expressão de VEGF, sendo a norepinefrina o

2008; DAS; SKOBE, 2008; SIRIWARDENA et al., 2008; MATSUURA et al., 2009; SUGIURA et al., 2009).

Em adipócitos marrons normais de ratos, Asano, Irie e Saito em 2001, avaliaram a expressão gênica dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) do tipo A, B e C por meio de *Northern blot*. As linhagens celulares foram cultivadas em dois momentos, como pré adipócitos e após a diferenciação celular em adipócitos. Em ambos os casos, a produção de RNAm para VEGF (do tipo A), VEGF-B, VEGF-C foram mensurados. Observaram que os pré adipócitos expressavam VEGF, VEGF-B e VEGF-C, entretanto, a menor expressão foi de VEGF. Notaram, também, que após a diferenciação celular, os adipócitos não mostraram alteração na expressão de VEGF-B e VEGF-C, no entanto, houve um aumento na expressão de RNAm para VEGF-A. Em seguida, estimularam os pré adipócitos com 1 μ M de norepinefrina e houve aumento da expressão de VEGF e diminuição de VEGF-C. No ensaio de estímulo dos pré adipócitos com 10 μ M de norepinefrina houve um aumento na expressão do gene de VEGF-A. Em adipócitos diferenciados o tratamento com 10 μ M de norepinefrina levou a diminuição da expressão de RNAm para VEGF-C. Os ensaios *in vitro* mostraram que, a norepinefrina aumentou a expressão de gene VEGF independente da diferenciação das células. Entretanto, a expressão gênica de VEGF-C com o estímulo da norepinefrina foi inibida independente da diferenciação celular dos adipócitos. Os autores sugeriram que a inibição de VEGF-C pode diminuir angiogênese e que os mecanismos adrenérgicos responsáveis pelo aumento da expressão de VEGF são diferentes daqueles que modulam a expressão de VEGF-C.

Lutgendorf e colaboradores (2003) pesquisaram, em linhagens celulares de câncer de ovário, a influência da norepinefrina, epinefrina e cortisol na progressão tumoral. Foi constatado nas linhagens, por meio de RT-qPCR, a presença dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 . Ao estimularem as culturas celulares com norepinefrina, epinefrina e isoproterenol verificaram, por meio de ELISA, o aumento da expressão de VEGF, sendo este efeito maior com norepinefrina e inibido pelo propanolol. Quando a cultura celular foi estimulada com cortisol ocorreram expressões variadas de VEGF com aumento ou diminuição dos níveis deste fator de crescimento. Os autores sugeriram que os mediadores do estresse agem sobre os β ARs modulando a expressão de VEGF, sendo a norepinefrina o

mediador mais potente que induz o aumento deste fator de crescimento, podendo influenciar a progressão tumoral do câncer de ovário.

Posteriormente, Taker et al em 2006 inocularam células de carcinoma de ovário e câncer de mama em ratos *nude* e os submeteram ao estresse crônico. Os animais que foram tratados com isoproterenol (agonista inespecíficos dos receptores beta), terbutalina (agonista β_2), mostraram aumento tumoral, enquanto aqueles tratados com xamoterol (agonista β_1) e propranolol (antagonista inespecífico dos receptores beta) não apresentaram crescimento tumoral. Notaram também, que em linhagens celulares de câncer de ovário negativas para β_1 e β_2 quando estimuladas com norepinefrina ou isoproterenol não houveram alterações significativas no peso tumoral, número de nódulos ou padrão de invasão celular. Utilizando silenciadores de expressão de gene (siRNA) específicos para β_1 e β_2 humano constataram que siRNA β_2 humano foi um eficiente bloqueador do crescimento tumoral. Por meio de ELISA evidenciaram que os efeitos angiogênicos foram simultâneos aos aumentos de expressão proteica de VEGF. Segundo este estudo os estímulos estressores ativaram a via do AMPc-proteína quinase A (PKA) modulando a expressão de VEGF. Verificaram ainda que, as células tumorais tratadas com a norepinefrina aumentaram a angiogênese, processo este bloqueado por inibidores de receptor VEGF-R2. Os autores concluíram que, a resposta neuroendócrina do estresse pode afetar, por meio dos receptores adrenérgico β_2 , a expressão de VEGF pela via PKA, resultando em aumento da vascularização tumoral, crescimento e proliferação das células malignas.

Em linhagens de carcinoma nasofaríngeo, Yang et al. (2006) avaliaram a influência da norepinefrina e epinefrina na produção de metaloproteinases da matriz MMP-2, MMP-9 e do fator de crescimento endotelial vascular. As células malignas foram estimuladas com norepinefrina sendo os aumentos nos níveis de MMP-2, MMP-9 e VEGF detectados por ensaio imunoenzimático (ELISA), entretanto, não houve aumento significativo na regulação da expressão gênica de VEGF. Através do sistema de invasão de membrana em cultura, os estímulos com epinefrina e a norepinefrina induziram uma maior capacidade de invasão tumoral. Foi mensurada, também, a atividade angiogênica através de ensaio de formação de tubo por células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), revelando que o estímulo da norepinefrina induziu a produção de VEGF funcional, porém ao bloquearem VEGF, a angiogênese não foi completamente inibida. Empregando RT-qPCR e *Western blot*

constatarem a expressão e presença dos receptores β adrenérgicos nas células malignas. Os pesquisadores sugeriram que o estresse está relacionado com a tumorigênese de carcinomas nasofaríngeos por meio da ação das catecolaminas nos β -ARs, influenciando diretamente a produção de enzimas proteolíticas (metaloproteinases) e de fatores de crescimento angiogênico (VEGF).

Em 2008, Liu e colaboradores investigaram a expressão de β -ARs e sua via de sinalização em carcinomas espinocelulares de esôfago. As culturas foram estimuladas com epinefrina, com atenolol, com ICI118.551, com um inibidor específico do MEK e com nimesulida. Para quantificar a proliferação celular os pesquisadores empregaram a análise de incorporação de $[3H]$ -timidina e para determinar a expressão dos β -ARs, COX-2, VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 empregaram RT-qPCR e *Western blot*. Todas as culturas expressaram RNAm β 1 e β 2. A epinefrina aumentou a proliferação celular, indicando um importante envolvimento dos β -ARs. O aumento da proliferação celular foi simultâneo a níveis aumentados de AMPc, da fosforilação de ERK 1/2 e de RNAm para COX-2, sugerindo assim, uma possível conexão entre a estimulação dos β -ARs e a proliferação celular. Os resultados demonstraram que, os inibidores de ERK 1/2 e da COX-2 anularam o estímulo proliferativo propiciado pela epinefrina. Houve um aumento significativo na expressão de VEGF e VEGFR na presença da epinefrina, que foram inibidas por antagonistas de β -ARs, especialmente do β 2-AR. Os pesquisadores concluíram que as células malignas expressaram receptores β -ARs, os quais, ao serem estimulados pela epinefrina, promoveram proliferação celular por ativação da via AMPc–ERK1/2–COX-2. O aumento da expressão de VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2, revelou o possível envolvimento dos β -ARs em metástase de carcinoma espinocelular de esôfago.

Posteriormente, Guo et al. (2009), investigaram o papel da norepinefrina na modulação do potencial de invasão e metástase de células tumorais de câncer de pâncreas. Utilizando as linhagens de câncer de pâncreas (Miapaca-2 e Bxpc-3) constatarem a presença de β 1-AR e β 2-AR por meio de RT-qPCR e a expressão de β 2-AR por meio de *Western blot*. Ao estimularem a linhagem Miapaca-2 com diversas concentrações de norepinefrina, o efeito mais significativo foi obtido com a concentração de $1\mu M$, seguida pela concentração de $10\mu M$. Quando a cultura foi previamente tratada com $1\mu M$ de propranolol e, posteriormente, estimulada com $10\mu M$ de norepinefrina ocorreu uma redução no potencial de invasividade das

células tumorais. Ainda, com o estímulo de 10 μ M de norepinefrina, o teste ELISA evidenciou um aumento nos níveis de VEGF, MMP-2 e MMP-9, dados estes, confirmados pelo RT-qPCR sobre as expressões gênicas dessas moléculas. Os autores mostraram que a norepinefrina, pode aumentar diretamente o potencial de invasão das células do câncer de pâncreas e aumentar a expressão de MMP-2, MMP-9 e VEGF, por meio da ativação dos receptores β adrenérgicos. Sugeriram então, que a norepinefrina age no microambiente tumoral do câncer de pâncreas influenciando o desenvolvimento de metástases.

Também em cultura de câncer de próstata (Du-145 e PC-3), de câncer de mama (MDA-MB-231 e MDA-MB-435s) e de carcinoma hepatocelular (SK-Hep1 e Hep3B), a ação das catecolaminas, via receptores adrenérgicos, e sua possível influência na angiogênese tumoral foi investigada por Park et al. (2011). Os estímulos das células malignas com norepinefrina mostraram aumentos da expressão gênica e proteica de VEGF e na produção de RNAm para HIF-1 α . Entretanto, o estímulo com norepinefrina em células com silenciamento do gene HIF-1 α não expressaram VEGF. Em células estimuladas com norepinefrina e com tratamento prévio com inibidores de β -ARs houve inibição da expressão de VEGF e HIF-1 α em todas as linhagens celulares. As linhagens que apresentaram os receptores α 1-AR foram estimuladas com norepinefrina e pré-tratadas com bloqueador α 1-AR, porém, somente em uma amostra de hepatocarcinoma (SK-Hep1) e uma de câncer de próstata (PC-3) ocorreu inibição da expressão de HIF-1 α , de VEGF e da formação do tubo capilar. Os resultados deste estudo mostraram que a norepinefrina está diretamente ligada a formação da proteína HIF-1 α que por sua vez, foi capaz de aumentar a expressão do VEGF modulando a angiogênese nas células cancerosas.

Recentemente, Madden, Szpunar e Brown (2011) analisaram a expressão dos β -ARs e seu envolvimento na angiogênese por meio da produção de VEGF e IL-6 em adenocarcinomas de mama humano. Algumas linhagens celulares (MCF7 e MB-361) apresentaram baixas expressões de β -ARs, entretanto outras (MB-231 e MB-231BR) exibiram alta expressão desses receptores. Utilizando a terbutalina um agonista seletivo dos β 2-AR e isoproterenol, os autores observaram aumento na produção de VEGF na linhagem celular MB-231BR e, em contraste, a inibição na produção de VEGF na linhagem celular MB-231. A maior concentração testada de isoproterenol (10 μ M) aumentou discretamente a produção do VEGF na linhagem

células tumorais. Ainda, com o estímulo de 10 μ M de norepinefrina, o teste ELISA evidenciou um aumento nos níveis de VEGF, MMP-2 e MMP-9, dados estes, confirmados pelo RT-qPCR sobre as expressões gênicas dessas moléculas. Os autores mostraram que a norepinefrina, pode aumentar diretamente o potencial de invasão das células do câncer de pâncreas e aumentar a expressão de MMP-2, MMP-9 e VEGF, por meio da ativação dos receptores β adrenérgicos. Sugeriram então, que a norepinefrina age no microambiente tumoral do câncer de pâncreas influenciando o desenvolvimento de metástases.

Também em cultura de câncer de próstata (Du-145 e PC-3), de câncer de mama (MDA-MB-231 e MDA-MB-435s) e de carcinoma hepatocelular (SK-Hep1 e Hep3B), a ação das catecolaminas, via receptores adrenérgicos, e sua possível influência na angiogênese tumoral foi investigada por Park et al. (2011). Os estímulos das células malignas com norepinefrina mostraram aumentos da expressão gênica e proteica de VEGF e na produção de RNAm para HIF-1 α . Entretanto, o estímulo com norepinefrina em células com silenciamento do gene HIF-1 α não expressaram VEGF. Em células estimuladas com norepinefrina e com tratamento prévio com inibidores de β -ARs houve inibição da expressão de VEGF e HIF-1 α em todas as linhagens celulares. As linhagens que apresentaram os receptores α 1-AR foram estimuladas com norepinefrina e pré-tratadas com bloqueador α 1-AR, porém, somente em uma amostra de hepatocarcinoma (SK-Hep1) e uma de câncer de próstata (PC-3) ocorreu inibição da expressão de HIF-1 α , de VEGF e da formação do tubo capilar. Os resultados deste estudo mostraram que a norepinefrina está diretamente ligada a formação da proteína HIF-1 α que por sua vez, foi capaz de aumentar a expressão do VEGF modulando a angiogênese nas células cancerosas.

Recentemente, Madden, Szpunar e Brown (2011) analisaram a expressão dos β -ARs e seu envolvimento na angiogênese por meio da produção de VEGF e IL-6 em adenocarcinomas de mama humano. Algumas linhagens celulares (MCF7 e MB-361) apresentaram baixas expressões de β -ARs, entretanto outras (MB-231 e MB-231BR) exibiram alta expressão desses receptores. Utilizando a terbutalina um agonista seletivo dos β 2-AR e isoproterenol, os autores observaram aumento na produção de VEGF na linhagem celular MB-231BR e, em contraste, a inibição na produção de VEGF na linhagem celular MB-231. A maior concentração testada de isoproterenol (10 μ M) aumentou discretamente a produção do VEGF na linhagem

celular MCF7 e não alterou a produção deste fator de crescimento angiogênico na linhagem celular MB-361. Os resultados do estímulo com norepinefrina sobre a produção de VEGF foram diferentes, ou seja, houve aumento em algumas linhagens celulares (MB-231BR) e inibição em outras linhagens celulares (MB-231). Os pesquisadores concluíram que a expressão e sinalização dos β -ARs são heterogêneas em linhagens celulares de câncer de mama. A ativação dos β -ARs em células tumorais com alta expressão desses receptores modula a produção de VEGF, estimulando ou inibindo, a via β -ARs/AMPc/PKA.

2.3 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR DO TIPO C (VEGF-C) E CÂNCER DE BOCA

O fator de crescimento endotelial vascular do tipo C (VEGF-C) é um dos membros da família de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) que vem sendo associado à formação de novos vasos linfáticos e a dilatação dos pré-existentes ao atuarem sobre o receptor VEGFR-3, presente no endotélio linfático (NEUCHRIST et al., 2003; LI et al., 2006; Warburton et al., 2007).

O VEGF-C é secretado também pelas células neoplásicas (Jakobisiak; Lasek; Golab, 2003; Kimura et al., 2008; Tanaka et al., 2010) e sua maior expressão em células malignas tem sido, frequentemente, correlacionada com a ocorrência de metástases sanguíneas e linfáticas (Achen; Mann; Stacker, 2006; Nakazato et al., 2006; Hirakawa et al., 2007; Su et al., 2007; Warburton et al., 2007; Achen; Stacker, 2008; Bock et al., 2008; Das; Skobe, 2008; Siriwardena et al., 2008; Matsushima et al., 2009).

Nos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, incluindo os de boca, o VEGF-C tem sido fortemente associado com a ocorrência de metástase linfonodal e consequentemente com a progressão tumoral, influenciando diretamente o prognóstico do paciente (Neuchrist et al., 2003; Li et al., 2006; Nakazato et al., 2006; Siriwardena et al., 2008; Sugiura et al., 2009; Chen et al., 2010).

A expressão de VEGF-C tem sido analisada, *in vitro*, em diferentes linhagens de carcinomas espinocelulares com variadas técnicas incluindo imunohistoquímica, qPCR, ELISA, Western Blot e citometria de fluxo (Kawakami et al.,

2003; BOCK et al., 2008; SIRIWARDENA et al., 2008; LIANG et al., 2010; LIU et al., 2010).

Em linhagem de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (SCCHNs) Bock et al. (2008) avaliaram a influência do fator de crescimento endotelial vascular C na invasão tumoral e mobilidade celular. Utilizaram clone celular transfectado para VEGF-C, RNAi para silenciar a expressão de VEGF-C, técnica de membrana semi-permeável, qPCR e *Western blot*. A linhagem celular que apresentou aumento na expressão proteica e de RNAm para VEGF-C mostrou maior capacidade de invasão e mais mobilidade celular em comparação ao controle. A inibição da expressão de VEGF-C induziu diminuição da capacidade de invasão e mobilidade celular das células de SCCHNs. Observaram, também variações consideráveis nas concentrações intracelulares de RNAm para VEGF-C nas linhagens de SCCHNs. Os autores sugeriram que, devido o VEGF-C ser um fator de crescimento excretado no meio intra e extracelular, a quantidade da proteína pode ser importante para delinear fenótipos invasivos. Adicionalmente, os diferentes níveis de VEGF-C nas culturas celulares podem ser devido á influências, *in vitro* e *in vivo*, de diversos fatores celulares e ambientais e, portanto, a expressão de VEGF-C pode não ser suficiente para promover a metástase e a invasão de SCCHNs. Contudo, os autores concluíram que, os níveis intracelulares de VEGF-C modulam, *in vitro*, mobilidade e capacidade de invasão celular em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, e sugeriram que a inibição de VEGF-C pode ser uma boa alternativa para auxiliar o tratamento da metástase linfática nesses tumores.

Matsuura et al. (2009) investigaram a expressão de VEGF-C e FLT-4 em carcinoma espinocelular de boca. Utilizaram xenoenxerto em ratos, RT-qPCR, qPCR, citometria de fluxo, imunohistoquímica e imunoblotting. As células malignas de boca foram transformadas em dn-SAS (exclusão do domínio citoplásmico FLT-4). *In vitro* e/ou *in vivo* as células dn-SAS mostraram redução do potencial de proliferação, diminuição da expressão gênica de VEGF-C e VEGF, além de, inibição da linfangiogênese. Em células tumorais humanas, os autores mostraram que VEGF-C por estimulação autócrina do FLT4, regula positivamente a expressão tanto de VEGF-A quanto de VEGF-C, dessa forma induzindo altos níveis de VEGF-C. Os autores sugeriram que o estímulo autócrino de VEGF-C/FLT-4 pode induzir a progressão do câncer, e que FLT-4 seria um alvo eficaz para terapia do cancer.

2003; BOCK et al., 2008; SIRIWARDENA et al., 2008; LIANG et al., 2010; LIU et al., 2010).

Em linhagem de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (SCCHNs) Bock et al. (2008) avaliaram a influência do fator de crescimento endotelial vascular C na invasão tumoral e mobilidade celular. Utilizaram clone celular transfectado para VEGF-C, RNAi para silenciar a expressão de VEGF-C, técnica de membrana semi-permeável, qPCR e *Western blot*. A linhagem celular que apresentou aumento na expressão proteica e de RNAm para VEGF-C mostrou maior capacidade de invasão e mais mobilidade celular em comparação ao controle. A inibição da expressão de VEGF-C induziu diminuição da capacidade de invasão e mobilidade celular das células de SCCHNs. Observaram, também variações consideráveis nas concentrações intracelulares de RNAm para VEGF-C nas linhagens de SCCHNs. Os autores sugeriram que, devido o VEGF-C ser um fator de crescimento excretado no meio intra e extracelular, a quantidade da proteína pode ser importante para delinear fenótipos invasivos. Adicionalmente, os diferentes níveis de VEGF-C nas culturas celulares podem ser devido á influências, *in vitro* e *in vivo*, de diversos fatores celulares e ambientais e, portanto, a expressão de VEGF-C pode não ser suficiente para promover a metástase e a invasão de SCCHNs. Contudo, os autores concluíram que, os níveis intracelulares de VEGF-C modulam, *in vitro*, mobilidade e capacidade de invasão celular em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, e sugeriram que a inibição de VEGF-C pode ser uma boa alternativa para auxiliar o tratamento da metástase linfática nesses tumores.

Matsuura et al. (2009) investigaram a expressão de VEGF-C e FLT-4 em carcinoma espinocelular de boca. Utilizaram xenoenxerto em ratos, RT-qPCR, qPCR, citometria de fluxo, imunohistoquímica e imunoblotting. As células malignas de boca foram transformadas em dn-SAS (exclusão do domínio citoplásmico FLT-4). *In vitro* e/ou *in vivo* as células dn-SAS mostraram redução do potencial de proliferação, diminuição da expressão gênica de VEGF-C e VEGF, além de, inibição da linfangiogênese. Em células tumorais humanas, os autores mostraram que VEGF-C por estimulação autócrina do FLT4, regula positivamente a expressão tanto de VEGF-A quanto de VEGF-C, dessa forma induzindo altos níveis de VEGF-C. Os autores sugeriram que o estímulo autócrino de VEGF-C/FLT-4 pode induzir a progressão do câncer, e que FLT-4 seria um alvo eficaz para terapia do cancer.

Recentemente, em 2010, Liang et al, investigaram a relação entre hipertermia local e expressão de VEGF-C e VEGF-D em carcinomas espinocelulares de língua. Após implantar células tumorais em camundongos, a hipertermia local foi provocada por aquecimento e a quantificação de VEGF-C e VEGF-D avaliada por qPCR, Western Blot e imuno-histoquímica. Tumores com hipertermia local cresceram menos que os do grupo controle. A expressão proteica e de RNAm para VEGF-C e VEGF-D foi inibida em tumores com hipertermia. E os tumores submetidos à hipertermia apresentaram imunomarcção mais discreta de VEGF-C e VEGF-D em comparação aos controles. Os pesquisadores sugeriram que a hipertermia local poderia prevenir as metástases linfáticas inibindo VEGF-C e VEGF-D em carcinomas espinocelulares de língua.

Outro estudo de Sasahira e colaboradores (2010) avaliaram a relação entre a angiogênese, linfangiogênese e a expressão do fator de atividade inibitória de melanoma (MIA) em carcinomas espinocelulares de boca. Em 18 amostras de tumores á fresco de carcinoma espinocelulares de boca analisaram por ensaio imunoenzimático (ELISA) a expressão proteica de VEGF, VEGF-C, VEGF-D e MIA, os resultados mostraram que a expressão de MIA foi significativamente relacionada à VEGF, VEGF-C e VEGF-D. Os ensaios com as linhagens celulares de carcinoma espinocelular de língua (HSC-3 e HSC-4) quantificaram por qPCR a expressão gênica de VEGF, VEGF-C, VEGF-D e MIA. A linhagem celular metastática HSC-3 apresentou maior expressão gênica de VEGF, VEGF-C, VEGF-D e MIA. Os ensaios de qPCR e ELISA demonstraram maior expressão de VEGF, VEGF-C, VEGF-D e MIA em tecidos neoplásicos em comparação com a mucosas adjacente considerados normais. Os autores concluíram que MIA pode promover angiogênese e linfangiogênese pela ativação de VEGF, VEGF-C e VEGF-D em carcinomas espinocelulares de língua, e sugeriram que MIA pode vir a ser útil para a terapia de bloqueio de angiogênese e linfangiogênese em câncer de língua.

Atualmente, Tanaka e colaboradores (2010) avaliaram a correlação entre VEGF-C, fatores clínico-patológicos e prognósticos em carcinomas espinocelulares de esôfago. Utilizando qPCR observaram que nas 12 linhagens celulares de carcinoma de esôfago a expressão de RNAm para VEGF-C foi maior do que na linhagem celular de mucosa saudável. As células tumorais de estágios mais avançados tiveram maior expressão de VEGF-C em relação aos tumores de estágios menos avançados. Pacientes com baixa expressão de VEGF-C

apresentaram uma sobrevida maior. As análises estatísticas mostraram correlação significativa entre os fatores clínico-patológicos, a extensão do tumor primário, as metástases linfonodais e a expressão de VEGF-C. Entretanto a extensão do tumor primário e as metástases linfonodais foram fatores que não influenciaram no prognóstico dos pacientes. Os autores sugeriram que VEGF-C pode ser um bom marcador molecular de prognóstico, bem como alvo para o um tratamento de pacientes com câncer esôfago.

Embora esta revisão de literatura demonstre que os neurohormônios como norepinefrina, epinefrina e cortisol parecem aumentar *in vitro* a expressão do fator de crescimento VEGF em células malignas, nenhum estudo foi encontrado investigando especificamente a modulação de VEGF-C por estes mediadores do estresse em carcinomas espinocelulares, inclusive de boca.

3 – Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A partir da análise de culturas de células de carcinomas espinocelulares de boca, estimuladas com norepinefrina propôs-se:

- 1) verificar a secreção do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C (VEGF-C) e os níveis de expressão deste fator de crescimento pelas células neoplásicas;
- 2) avaliar a produção de VEGF-C após estímulos com diferentes concentrações de norepinefrina.

Contribuir com o conhecimento da influência das catecolaminas na evolução tumoral, particularmente pela via de sinalização para produção do fator linfangiogênico VEGF-C.

4 – Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

O efeito da norepinefrina sobre as células neoplásicas malignas foi avaliado, *in vitro*, em duas linhagens de carcinoma espinocelular de boca, sendo ambas obtidas de um tumor de língua (SCC-9: homem de 25 anos e SCC25: homem de 70 anos). As linhagens celulares foram originalmente adquiridas da American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, e cedidas para este estudo pelo Dr Daniel Galera Bernabé da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.

As células neoplásicas foram mantidas e expandidas em meio de cultura composto por partes iguais de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) e meio de cultura F12 (DMEM/F12; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab Ltda, Campinas-SP), 100µg/mL de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 0,1% de gentamicina. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂.

4.2 ESTÍMULOS DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS COM NOREPINEFRINA E PROPRANOLOL

Ambas as linhagens celulares, SCC9 e SCC25, foram colocadas em placas de 24 poços, em quantidade equivalente $1,0 \times 10^5$ por poço. Sequencialmente, estas células malignas foram mantidas em meio de cultura DEMEM/F12 com 10%SFB. Ao atingirem 70% de confluência em cada poço, estas células foram mantidas em meio de cultura DMEM/F12 com concentrações reduzidas de SFB (0,1%) por 24 horas. As culturas de células neoplásicas foram estimuladas com o norepinefrina e com propranolol, um antagonista inespecífico dos receptores adrenérgicos. As concentrações foram determinadas segundo os níveis fisiológicos que poderiam atingir o microambiente tumoral (BIERHAUS et al., 2003; SOOD et al., 2006) e também, com base nas respostas dessas linhagens frente a essas concentrações verificadas anteriormente em 2009 por Bernabé e colaboradores. Nos ensaios experimentais, as células neoplásicas foram

estimuladas com norepinefrina (Calbiochemical Co) nas concentrações de 0,1, 1, 10 μ M, e com o propranolol (1 μ M) em períodos de 1, 6 e 24 horas, seguindo-se basicamente o mesmo protocolo utilizado por Bernabé et al.(2011).

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO VEGF-C POR REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE COM TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL (qPCR)

4.3.1 Extração de RNA

O RT-PCR em tempo real foi utilizado para quantificar a expressão de VEGF-C em linhagens celulares de carcinoma espinocelular de língua SCC9 e SCC25 tratadas com norepinefrina e propranolol. O RNA total de cada amostra foi extraído com reagente TRIzol (Invitrogen life Technologies, Carlsbad, CA), seguindo-se basicamente o protocolo do fabricante como descrito a seguir.

O TRIzol (1mL) foi adicionado em cada poço contendo as células tumorais, após os diferentes períodos de estímulo, coletado e armazenado a -80°C para futura extração do RNA total. No processo de extração a cada amostra de 1mL da suspensão de TRIzol foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (Sigma) e centrifugado a 15000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa contendo o mRNA foi transferida para um outro tubo, somou-se 500 μ L de isopropanol e, todos os exemplares foram agitados e, posteriormente, incubados durante a noite a -20°C. Sequencialmente, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g por 15 minutos a 4°C, sendo o precipitado lavado com 500 μ L de etanol 75% e centrifugado a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e o precipitado seco à temperatura ambiente, agregado 500 μ L de álcool 100% e as amostras foram incubadas durante todo período noturno a -80°C. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado, o precipitado seco a temperatura ambiente. As amostras de RNA foram ressuspensas em 20 μ L de água ultrapura livre de RNase e estocadas a -80°C para posterior síntese de DNA complementar.

4.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A qualidade e a quantidade do RNA obtido nas amostras tumorais foram analisadas por meio de espectofotometria. Seguiu-se a síntese de cDNA com

superscript II transcriptase reversa segundo as orientações do fabricante (Invitrogen Life Technologies). Foi usado 1µL de RNA total e realizada a termociclagem para produção do cDNA. Na seqüência, as amostras foram armazenadas a 4°C para posterior amplificação e quantificação de RNA mensageiro (RNAm).

4.3.3 Quantificação de RNAm para VEGF-C

Níveis de RNAm para VEGF-C foram quantificados pelo sistema Sybr Green no aparelho de PCR em tempo real Step-one (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com recomendações do fabricante, tendo o gene Beta-actina (β -actina) como controle endógeno. Os seguintes primers foram utilizados para β -actina: sense- 5'-TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG-3' e antisense - 5'-GCATTTGCGGTGGACGAT-3'. Para VEGF-C: sense 5'-CCG ATG CAT GTC TAA ACT GGA T -3' e antisense 5' - GCT GCC TGA CAC TGT GGT AGT- 3' (Bock, et al., 2008). A padronização da concentração e a validação da eficiência da reação foram realizadas para todos os conjuntos de primers. As amostras foram corridas em duplicatas compostas de 10µL de Sybr Green, primer β -actina em concentração de 200nM ou VEGF-C a 300nM, água ultra pura, tendo volume final 20µL cada uma das reações. As condições térmicas de ciclagem usadas foram universais de acordo com orientações do fabricante. Os níveis de expressão de cada gene por amostra foram normalizados para os níveis de β -actina. A quantidade relativa (RQ) de RNAm para cada gene alvo foi calculada utilizando o método de C_T comparativo. Os resultados foram apresentados em quantidade de vezes de aumento ou redução da expressão do gene alvo (VEGF-C) nas células estimuladas com norepinefrina em relação às células não estimuladas (controle).

4.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE VEGF-C NO SOBRENADANTE CELULAR POR ELISA

Os sobrenadantes produzidos pelas linhagens SCC-9 e SCC-25, após os estímulos com norepinefrina e propranolol, foram coletados e armazenados a - 80°C. Posteriormente, os sobrenadantes foram usados para quantificar a expressão do

VEGF-C determinada por ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA Quantikine Kit - R&D Systems) seguindo as instruções do fabricante.

Em placas de 96 poços foram adicionados 100µL de diluente tampão RDW1, 50µL de cada sobrenadante (SCC-9 ou SCC-25) e as placas foram incubadas em agitador orbital horizontal (agitador RT) por 2 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de lavagem e incubadas com 200µL de conjugado de anticorpo policlonal VEGF-C por 2 horas em agitador RT. Repetiu-se o processo de lavagem e as placas foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz, com 200µL da solução substrato. Após esse período foram adicionados 50µL de solução stop e realizada a leitura em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450nm. Neste ensaio, a curva padrão foi realizada em duplicata e as amostras de sobrenadante celular, separadas de acordo com o estímulo (norepinefrina ou propranolol) e os diferentes períodos de exposição (1, 6, 24h), foram corridas em triplicatas.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância – ANOVA com teste de correção Bonferroni, considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Dados da análise quantitativa do RT-PCR em tempo real foram apresentados em quantas vezes a expressão do gene alvo (VEGF-C) aumentou ou diminuiu em relação ao controle (células não estimuladas).

4.6 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 de 28 de Maio de 2010, sob o número 068/2010 .

5 – Resultados

5 RESULTADOS

Com os resultados dos experimentos dessa pesquisa foi analisado se o mediador do estresse norepinefrina, ao se ligar com os receptores beta-adrenérgicos presente constitutivamente nas células de duas linhagens de carcinoma espinocelular de língua (SCC-9 e SCC-25) (BERNABÉ et al., 2011), ativava a via de sinalização para produção do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C (VEGF-C).

As análises foram realizadas em duas etapas, descritas a seguir:

- ✓ expressão do gene VEGF-C nas linhagens de células malignas utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR);
- ✓ quantificação da proteína VEGF-C no sobrenadante das culturas celulares tumorais pelo ensaio imunoenzimático (ELISA).

5.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)

A expressão gênica de VEGF-C foi quantificada pela produção de RNAm após o estímulo das células tumorais com norepinefrina em diferentes concentrações (0,1, 1 e 10 μ M) e com o propranolol em concentração de 1 μ M. A expressão de VEGF-C foi determinada nos períodos de 1, 6 e 24 horas após o estímulo com a catecolamina. A expressão de VEGF-C determinada, por meio de qPCR, nas células malignas controles das linhagens SCC-9 e SCC-25 apresentaram valor médio de 1 Log₁₀, evidenciado nos gráficos como 100%.

5.1.1 Carcinoma espinocelular humano de boca – linhagem SCC-9

No período de uma hora após o estímulo com 0,1 μ M de norepinefrina (Gráfico 1), houve uma tendência de inibição (39,4%) da expressão do VEGF-C nas células neoplásicas. Entretanto, esta tendência não foi mantida com o aumento da concentração de norepinefrina (1 e 10 μ M) como pode ser observado no Gráfico 1. Quando o propranolol foi utilizado para estimular a cultura, a tendência de inibição foi de 12,98% em relação ao controle (células não estimuladas).

Gráfico 1- Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) uma hora após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo)

No ensaio de 6 horas (Gráfico 2) observou-se uma inibição de 26,5% e 28,4% na expressão do RNAm para VEGF-C nas células malignas de SCC-9, após o estímulo com norepinefrina em concentrações de 0,1 μ M e 10 μ M, respectivamente, porém sem significância estatística. A expressão gênica de VEGF-C em SCC-9 após o estímulo com 1 μ M de norepinefrina ou com o propranolol se manteve muito próxima do controle (Gráfico 2).

Gráfico 2- Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P=propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

A linhagem SCC-9 no ensaio de 24 horas (Gráfico 3) com estímulo de 0,1 μ M de norepinefrina manteve a expressão de VEGF-C muito próxima do controle. Entretanto, o estímulo com 1 μ M de norepinefrina e 1 μ M de propranolol demonstraram uma tendência a aumentar a expressão do gene VEGF-C na linhagem SCC-9, em 27,06% e 31,32%, respectivamente, em relação ao controle. Na concentração de 10 μ M de norepinefrina houve uma tendência de inibição de 22,46% no RNAm para VEGF-C, como pode ser visualizado no Gráfico 3.

No ensaio de 6 horas (Gráfico 2) observou-se uma inibição de 26,5% e 28,4% na expressão do RNAm para VEGF-C nas células malignas de SCC-9, após o estímulo com norepinefrina em concentrações de 0,1 μ M e 10 μ M, respectivamente, porém sem significância estatística. A expressão gênica de VEGF-C em SCC-9 após o estímulo com 1 μ M de norepinefrina ou com o propranolol se manteve muito próxima do controle (Gráfico 2).

Gráfico 2- Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P=propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

A linhagem SCC-9 no ensaio de 24 horas (Gráfico 3) com estímulo de 0,1 μ M de norepinefrina manteve a expressão de VEGF-C muito próxima do controle. Entretanto, o estímulo com 1 μ M de norepinefrina e 1 μ M de propranolol demonstraram uma tendência a aumentar a expressão do gene VEGF-C na linhagem SCC-9, em 27,06% e 31,32%, respectivamente, em relação ao controle. Na concentração de 10 μ M de norepinefrina houve uma tendência de inibição de 22,46% no RNAm para VEGF-C, como pode ser visualizado no Gráfico 3.

Gráfico 3- Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1μM de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P=propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

5.1.2 Carcinoma espinocelular humano de boca – linhagem SCC-25

Na linhagem SCC-25, uma hora após (Gráfico 4) o estímulo com 0,1 e 1μM de norepinefrina e 1μM de propranolol promoveu uma discreta diminuição, sem significância estatística, na expressão do gene VEGF-C nas células malignas. Na concentração de 10μM de norepinefrina, os níveis de RNAm para VEGF-C se mantiveram próximos ao controle.

Gráfico 4- Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) uma hora após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com $1\mu\text{M}$ de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

Após 6 horas (Gráfico 5) de estímulo das células neoplásicas SCC-25 com $0,1\mu\text{M}$ norepinefrina notou-se uma tendência de inibição (48,52%) na expressão RNAm para VEGF-C. Todavia nas concentrações de $1\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$ de norepinefrina e $1\mu\text{M}$ de propranolol discretos aumentos na expressão de VEGF-C foram observados nas culturas de SCC-25.

No experimento de 24 horas, a tendência inibitória de VEGF-C na linhagem SCC-25 foi observada após o estímulo com $0,1\mu\text{M}$ ou $10\mu\text{M}$ de norepinefrina. O estímulo com $1\mu\text{M}$ de propranolol ou $1\mu\text{M}$ de norepinefrina mostrou expressão gênica de VEGF-C similar ao controle (Gráfico 6).

Gráfico 5- Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não tratadas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

Gráfico 6- Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

Gráfico 5- Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não tratadas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

Gráfico 6- Expressão de VEGF-C em células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a porcentagem que a expressão do RNAm para VEGF-C aumentou ou diminuiu em relação à expressão do controle (células não estimuladas). O valor do controle fixado foi de 100% em toda a série experimental. P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

5.1.3 Comparações da expressão de VEGF-C nas linhagens SCC-9 e SCC-25

Em análise geral e comparativa entre SCC-9 e SCC-25 notou-se um comportamento irregular na produção de RNAm para VEGF-C em ambas linhagens, quando comparadas aos seus respectivos controles (células não estimuladas).

Na concentração de 0,1µM de norepinefrina houve uma tendência, ao longo do tempo, de um efeito inibitório da expressão de VEGF-C nas células neoplásicas das duas linhagens estudadas. Quando as linhagens celulares foram estimuladas com 10µM de norepinefrina, concentração esta que simularia condições de estresse, o efeito inibitório da expressão de VEGF-C foi verificado após 6 e 24h para a linhagem SCC-9 e apenas após 24h para a linhagem SCC-25. Nas células SCC-9, na presença de 1µM de norepinefrina foi observado uma maior capacidade de induzir aumentos nos níveis de RNAm para VEGF-C.

Foi possível verificar, nas duas linhagens celulares, que de um modo geral o propranolol, antagonista inespecífico de receptores β -adrenérgicos, não inibiu a produção constitutiva de VEGF-C celular. Em SCC-9, houve uma tendência de aumento da expressão gênica de VEGF-C pelo propranolol ao longo do tempo.

Embora os gráficos apresentem variações na expressão gênica de VEGF-C após estímulo com norepinefrina e propranolol, não houve diferenças estatísticas em relação ao controle (células não estimuladas) em nenhum dos períodos experimentais analisados.

5.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

A expressão de VEGF-C foi quantificada pela presença desta proteína no sobrenadante das culturas de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25, após estímulos com norepinefrina em diferentes concentrações (0,1; 1 e 10 μM) e com 1 μM de propranolol. As análises foram feitas em três períodos (1, 6 e 24 horas).

5.2.1 Carcinoma espinocelular humano de boca – linhagem SCC-9

A linhagem SCC-9 após uma hora (Gráfico 7) de estímulos com 0,1 ou 1 μM , de norepinefrina mostrou uma tendência de aumento na produção de VEGF-C no sobrenadante da cultura celular. Entretanto o estímulo com 10 μM de norepinefrina e com 1 μM de propranolol induziu inibição de VEGF-C.

Gráfico 7- Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) uma hora após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μM de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

No ensaio de 6 horas (Gráfico 8) após estimular as células malignas da linhagem SCC-9 com 0,1 μ M e 10 μ M de norepinefrina houve uma tendência a aumentar a produção protéica de VEGF-C. Estímulos das células de SCC-9 com 1 μ M de norepinefrina ou com 1 μ M de propranolol manteve os níveis de expressão de VEGF-C similar ao do controle.

Gráfico 8- Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

A linhagem SCC-9, no período de 24 horas (Gráfico 8), após o estímulo de 10 μ M de norepinefrina mostrou uma significativa inibição na produção de VEGF-C ($p < 0,001$). Observou-se, também, que o estímulo com 1 μ M de norepinefrina ou 1 μ M de propranolol houve uma tendência inibitória da expressão de VEGF-C produzida pelas células malignas. A expressão de VEGF-C após o estímulo de 0,1 μ M de norepinefrina se manteve muito próxima do controle.

No ensaio de 6 horas (Gráfico 8) após estimular as células malignas da linhagem SCC-9 com 0,1 μ M e 10 μ M de norepinefrina houve uma tendência a aumentar a produção protéica de VEGF-C. Estímulos das células de SCC-9 com 1 μ M de norepinefrina ou com 1 μ M de propranolol manteve os níveis de expressão de VEGF-C similar ao do controle.

Gráfico 8- Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1 μ M de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

A linhagem SCC-9, no período de 24 horas (Gráfico 8), após o estímulo de 10 μ M de norepinefrina mostrou uma significativa inibição na produção de VEGF-C ($p < 0,001$). Observou-se, também, que o estímulo com 1 μ M de norepinefrina ou 1 μ M de propranolol houve uma tendência inibitória da expressão de VEGF-C produzida pelas células malignas. A expressão de VEGF-C após o estímulo de 0,1 μ M de norepinefrina se manteve muito próxima do controle.

Gráfico 9- Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-9) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1μM de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas)
 P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo),
 * indica diferença estatística em comparação ao controle ($p < 0,001$)

5.2.2 Carcinoma espinocelular humano de boca – linhagem SCC-25

Na linhagem SCC-25, uma hora após (Gráfico 10) o estímulo com 1μM e 10μM de norepinefrina mostraram uma tendência ao aumento da expressão protéica de VEGF-C. Entretanto, o estímulo de 0,1μM de norepinefrina revelou tendência inibitória na produção de VEGF-C pelas células tumorais. Uma hora após o estímulo das células com 1μM de propranolol houve um aumento, estatisticamente significativo ($p < 0,01$), da produção de VEGF-C nas células neoplásicas quando comparada ao controle (células não estimuladas).

Gráfico 10- Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) uma hora após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com 1µM de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo),
* indica diferença estatística em comparação ao controle ($p < 0,01$)

No ensaio de 6 horas (Gráfico 11) observou-se uma discreta tendência de inibição da expressão de VEGF-C na linhagem celular de SCC-25, após o estímulo com 1µM e 10µM de norepinefrina. A produção de VEGF-C no sobrenadante das células malignas após o estímulo com 0,1µM de norepinefrina ou com 1µM de propranolol, praticamente, não variou em relação ao controle.

No período de 24 horas (Gráfico 12) após os estímulos com 0,1µM, 1µM, 10µM de norepinefrina, e também com 1µM de propranolol as células da linhagem SCC-25 basicamente não mostraram alterações na produção protéica de VEGF-C em relação ao controle (células não estimuladas).

Gráfico 11- Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com $1\mu\text{M}$ de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

Gráfico 12- Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com $1\mu\text{M}$ de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

Gráfico 11- Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) seis horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com $1\mu\text{M}$ de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

Gráfico 12- Quantidade de VEGF-C no sobrenadante produzido pela cultura de células neoplásicas de carcinoma espinocelular humano de boca (SCC-25) vinte e quatro horas após o estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina e com $1\mu\text{M}$ de propranolol. Os dados representam a comparação entre as concentrações de VEGF-C no sobrenadante das células SCC-9 estimuladas e das células controle (não estimuladas) P= propranolol, C=controle (VEGF-C constitutivo).

5.2.3 Comparações da expressão de VEGF-C nas linhagens SCC-9 e SCC-25

Nos ensaios imunoenzimáticos as linhagens celulares de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 e SCC-25 mostraram um comportamento irregular na expressão protéica de VEGF-C nos sobrenadantes das culturas celulares quando comparadas aos seus respectivos grupos controle (sem estímulo).

Embora em ambas as linhagens observaram-se variações de tendências de inibição ou aumento na expressão de VEGF-C somente alguns resultados revelaram significância estatística. A produção de VEGF-C no sobrenadante da linhagem celular SCC-9, somente mostrou inibição, estatisticamente significativa ($p < 0,001$), no ensaio de 24 horas após o estímulo com $10\mu\text{M}$ de norepinefrina. Na linhagem SCC-25 o ensaio de uma hora com $1\mu\text{M}$ de propranolol mostrou um aumento significativo ($p < 0,01$) na produção de VEGF-C pelas células malignas.

6 – Discussão

6 DISCUSSÃO

A participação dos neurohormônios do estresse na tumorigênese, por meio da ação das catecolaminas (norepinefrina e epinefrina), vem sendo associada com o crescimento e o potencial metastático das células neoplásicas (TILAN; KITLINSKA, 2010; BERNABÉ et al., 2011; PARK et al., 2011). Essas catecolaminas atuam via ativação dos receptores beta-adrenérgicos e muitos dos seus efeitos são simulados, em linhagens de carcinomas, por agonistas e bloqueados por antagonistas destes receptores (THAKER et al., 2006; GUO et al., 2009; BERNABÉ et al., 2011; MADDEN; SZPUNAR; BROWN, 2011; PARK et al., 2011).

Além do aumento da proliferação celular, a ação das catecolaminas, particularmente da norepinefrina, foi associada com maior vascularização tumoral elevando os níveis do fator de crescimento endotelial vascular (LUTGENDORF et al., 2003; THAKER et al., 2006; YANG et al., 2006; CHAN; LIN; LIN, 2008; YANG et al., 2008; GUO et al., 2009; YANG et al., 2009; MADDEN; SZPUNAR; BROWN, 2011; PARK et al., 2011). Adicionalmente, foi demonstrado que tumores de carcinoma de ovário derivados de animais estressados tinham maiores concentrações de VEGF e outros fatores angiogênicos, sendo o crescimento tumoral induzido por ativação dos receptores beta-adrenérgicos e inibido por bloqueio da via VEGF (THAKER et al., 2006). Então, com base nestas informações, foi sugerido que o estímulo da angiogênese tumoral parece ser o principal mecanismo do crescimento neoplásico induzido pelas catecolaminas como norepinefrina e epinefrina (TILAN; KITLINSKA, 2010).

Portanto, o presente estudo foi proposto visando investigar se o estímulo, *in vitro*, do mediador do estresse norepinefrina modula a produção do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C, um dos membros da família VEGF, em células malignas de carcinoma espinocelular de boca.

Vários estudos mostraram que o fator linfangiogênico VEGF-C apresenta uma forte associação com a ocorrência de metástase linfonodal e, conseqüentemente, com a progressão tumoral em câncer de boca (O-CHAROENRAT; RHYS-EVANS; ECCLES, 2001; NEUCHRIST et al., 2003; LI et al.,

2006; NAKAZATO et al., 2006; WARBURTON et al., 2007; SIRIWARDENA et al., 2008; SUGIURA et al., 2009), influenciando diretamente o prognóstico do paciente com câncer (PIMENTA AMARAL et al., 2004; BOCK et al., 2008)

No presente estudo, a norepinefrina foi a catecolamina de eleição devido a sua capacidade de ativar os β -ARs presentes nas linhagens de carcinomas espinocelulares de boca (SHANG; LIU; LIANG, 2009; BERNABÉ et al., 2011). A presença constitutiva dos receptores beta adrenérgicos do tipo 1 e 2 (β 1-AR e β 2-AR) nas duas linhagens celulares de carcinomas espinocelulares de língua (SCC-9 e SCC-25) que utilizamos, foi demonstrada por Bernabé e colaboradores (2011). As concentrações da norepinefrina empregadas para estímulo das células malignas também reproduziram aquelas previamente descritas nos ensaios experimentais de Bernabé et al. (2011).

Deve ser ressaltado, entretanto, que não foram encontradas investigações a respeito da modulação, *in vitro*, da norepinefrina na produção de VEGF-C por células neoplásicas especificamente de câncer de boca.

Por meio de qPCR foi avaliada e confirmada a expressão do gene VEGF-C nas células malignas não estimuladas (controle) das linhagens SCC-9 e SCC-25. A mesma expressão gênica para VEGF-C em células de carcinoma espinocelular de língua não estimuladas foi determinada no estudo de Sasahira et al. (2010) e de Tanaka et al. (2010).

Ao analisarmos a produção de RNAm para VEGF-C após as células serem estimuladas com 0,1 μ M de norepinefrina, observamos que, ao longo do tempo, houve uma tendência inibitória da expressão deste fator de crescimento nas células das duas linhagens estudadas (SCC-9 e SCC-25).

Adicionalmente, ao estimularmos as culturas celulares com 10 μ M de norepinefrina, concentração que simulava condições de estresse, o efeito inibitório da expressão de VEGF-C foi verificado após 6 e 24h para a linhagem SCC-9 e após 24h na linhagem SCC-25. Resultados similares aos descritos acima foram encontrados por Asano, Irie e Saito (2001), um dos únicos estudos na literatura inglesa que avaliou a expressão de VEGF-C após estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina. Estes autores (ASANO; IRIE; SAITO, 2001) também demonstraram uma diminuição na expressão de RNAm para VEGF-C após estímulo de adipócitos marrons com 10 μ M de norepinefrina.

Diferentemente aos nossos resultados, Guo et al. (2009) após 24h do estímulo com 10 μ M de norepinefrina em células de câncer de pâncreas e Park et al. (2011) após 3h do estímulo com esta mesma concentração da catecolamina em linhagens de câncer de próstata, câncer de mama e de carcinoma hepatocelular, observaram aumento da expressão gênica de VEGF. Contudo torna-se importante ressaltar que a sigla VEGF refere-se ao fator de crescimento endotelial vascular do tipo A. Além disso, nenhum dos estudos acima analisou especificamente o VEGF-C em câncer de boca, limitando assim, a comparação direta com nossos achados.

Curiosamente, quando as células SCC-9 foram estimuladas com 1 μ M de norepinefrina observou-se uma maior tendência a induzir aumentos nos níveis de RNAm para VEGF-C nos ensaios experimentais de 1h e 24h. Em células normais como pré-adipócitos, Asano, Irie e Saito (2001) mostrou um efeito oposto à tendência inibitória encontrada em nossos resultados, ou seja, observaram uma diminuição da expressão de RNAm para VEGF-C após estímulo com 1 μ M de norepinefrina.

Nos ensaios de inibição com 1 μ M de propranolol, antagonista inespecífico de receptores β -adrenérgicos, as linhagens celulares SCC-9 e SCC-25, de um modo geral, não tiveram suas expressões de VEGF-C inibidas. Também foi verificado que na linhagem SCC-9 houve uma tendência de aumento da expressão gênica de VEGF-C ao longo do tempo.

Estes resultados sugerem que a expressão gênica de VEGF-C em células do carcinoma espinocelular de boca parece ser independente da ativação de receptores beta-adrenérgicos. Todavia, a capacidade do propranolol em inibir a expressão gênica de VEGF (do tipo A) após o estímulo com norepinefrina foi demonstrada por Thaker et al.(2006) em câncer de ovário e Park et al.(2011) em câncer de próstata, câncer de mama e hepatocarcinoma. Estariam os receptores beta-adrenérgicos envolvidos apenas na modulação do fator de crescimento endotelial vascular do tipo A no câncer de boca?

A resposta para este questionamento requer a realização de outros ensaios experimentais em linhagens de carcinoma espinocelular de boca visando confirmar os resultados deste estudo e comparar a expressão simultânea de VEGF-C e VEGF-A após o estímulo com mediadores do estresse como a norepinefrina.

Todavia devemos lembrar que os fatores de crescimento do tipo A e do tipo C embora pertencendo à mesma família, atuam em receptores celulares

diferentes (NICOSIA, 1998; O-CHAROENRAT; RHYS-EVANS; ECCLES, 2001). O VEGF-A atua nos receptores VEGFR-2 presente no endotélio sanguíneo, enquanto o VEGF-C atua tanto nos receptores VEGFR-2 quanto naqueles VEGFR-3, presente no endotélio linfático, sendo por isso associado à linfangiogênese. Portanto, estes fatores de crescimento podem apresentar vias de sinalização celulares diferentes para sua produção em células neoplásicas (NICOSIA, 1998).

A expressão de VEGF-C após as linhagens celulares SCC-9 e SCC-25 serem estimuladas com norepinefrina foi determinada, no presente trabalho, por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Estudos com a mesma técnica e com os mesmos estímulos de norepinefrina foram realizados em diferentes tipos de células neoplásicas malignas, porém, o fator angiogênico investigado foi o VEGF-A (LUTGENDORF et al., 2003; YANG et al., 2006; GUO et al., 2009; MADDEN; SZPUNAR; BROWN, 2011; PARK et al., 2011). Todavia, até o presente momento, não foram encontrados estudos avaliando a influência das catecolaminas na modulação da proteína VEGF-C em células malignas.

Em nossos ensaios experimentais, ambas as linhagens celulares, SCC-9 e SCC-25, mostraram um comportamento irregular na produção de VEGF-C, após estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina, apresentando variações com tendências de inibição e de aumento na expressão deste fator de crescimento. Corroborando com nossos dados Park et al. (2011) ao estimularem com 10 μ M de norepinefrina linhagens celulares de câncer de próstata, mama e carcinoma hepatocelular obtiveram resultados variados na produção proteica de VEGF e também, recentemente, Madden, Szpunar e Brown (2011) em duas linhagens de adenocarcinoma de mama notaram comportamentos irregulares na produção de VEGF após estímulos com 0,1, 1, 5 e 10 μ M de norepinefrina.

Um resultado significativo de inibição de VEGF-C foi observado nos sobrenadantes da linhagem celular SCC-9 após 24 horas do estímulo com 10 μ M de norepinefrina refletindo a inibição gênica de VEGF-C detectada no qPCR neste mesmo período experimental. Esses resultados reforçam os de Madden, Szpunar e Brown (2011) que também demonstraram uma inibição da produção proteica de VEGF após estimularem as células de adenocarcinoma de mama com 10 μ M de norepinefrina.

Por outro lado, nossos resultados contrariam os achados em células de câncer de ovário (LUTGENDORF et al., 2003), de carcinoma nasofaríngeo (YANG et

diferentes (NICOSIA, 1998; O-CHAROENRAT; RHYS-EVANS; ECCLES, 2001). O VEGF-A atua nos receptores VEGFR-2 presente no endotélio sanguíneo, enquanto o VEGF-C atua tanto nos receptores VEGFR-2 quanto naqueles VEGFR-3, presente no endotélio linfático, sendo por isso associado à linfangiogênese. Portanto, estes fatores de crescimento podem apresentar vias de sinalização celulares diferentes para sua produção em células neoplásicas (NICOSIA, 1998).

A expressão de VEGF-C após as linhagens celulares SCC-9 e SCC-25 serem estimuladas com norepinefrina foi determinada, no presente trabalho, por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Estudos com a mesma técnica e com os mesmos estímulos de norepinefrina foram realizados em diferentes tipos de células neoplásicas malignas, porém, o fator angiogênico investigado foi o VEGF-A (LUTGENDORF et al., 2003; YANG et al., 2006; GUO et al., 2009; MADDEN; SZPUNAR; BROWN, 2011; PARK et al., 2011). Todavia, até o presente momento, não foram encontrados estudos avaliando a influência das catecolaminas na modulação da proteína VEGF-C em células malignas.

Em nossos ensaios experimentais, ambas as linhagens celulares, SCC-9 e SCC-25, mostraram um comportamento irregular na produção de VEGF-C, após estímulo com diferentes concentrações de norepinefrina, apresentando variações com tendências de inibição e de aumento na expressão deste fator de crescimento. Corroborando com nossos dados Park et al. (2011) ao estimularem com 10 μ M de norepinefrina linhagens celulares de câncer de próstata, mama e carcinoma hepatocelular obtiveram resultados variados na produção proteica de VEGF e também, recentemente, Madden, Szpunar e Brown (2011) em duas linhagens de adenocarcinoma de mama notaram comportamentos irregulares na produção de VEGF após estímulos com 0,1, 1, 5 e 10 μ M de norepinefrina.

Um resultado significativo de inibição de VEGF-C foi observado nos sobrenadantes da linhagem celular SCC-9 após 24 horas do estímulo com 10 μ M de norepinefrina refletindo a inibição gênica de VEGF-C detectada no qPCR neste mesmo período experimental. Esses resultados reforçam os de Madden, Szpunar e Brown (2011) que também demonstraram uma inibição da produção proteica de VEGF após estimularem as células de adenocarcinoma de mama com 10 μ M de norepinefrina.

Por outro lado, nossos resultados contrariam os achados em células de câncer de ovário (LUTGENDORF et al., 2003), de carcinoma nasofaríngeo (YANG et

al., 2006), de câncer de pâncreas (GUO et al., 2009), de câncer de mama (PARK et al., 2011; MADDEN; SZPUNAR; BROWN, 2011), de câncer de próstata e de carcinoma hepatocelular (PARK et al., 2011), onde ocorreram aumento da expressão proteica de VEGF (do tipo A) após estímulo com 10 μ M de norepinefrina. Essa variabilidade na expressão proteica de VEGF-C reforça as afirmativas de Bock que, os diferentes níveis de VEGF-C nas culturas celulares pode sofrer influências, *in vitro* e também *in vivo*, de fatores celulares e ambientais, que deveriam ser melhores investigados.

Um aumento significativo na produção de VEGF-C pelas células SCC-25 foi mostrado após estímulo com 1 μ M de propranolol. Inversamente a esse achado, o estudo que estimulou células de câncer de pâncreas (GUO et al., 2009) com propranolol demonstrou uma inibição da produção de VEGF (do tipo A).

Com base nos diferentes achados a respeito da expressão de VEGF-C em linhagens de células neoplásicas, incluindo os do presente estudo, fica claro que as ações vasculogênicas de norepinefrina, via receptores beta-adrenérgicos, na modulação da expressão de fatores angiogênicos, diferem entre os vários tipos tumorais, conforme previamente sugerido por Tilan e Kitlinska (2011).

Este estudo não observou relação entre a expressão gênica e a produção de VEGF-C após o estímulo com norepinefrina e propranolol. Nossos resultados sugerem que a modulação da proteína VEGF-C parece não ser resultado de atividade transcricional desta via específica. Esta informação corrobora com os achados de Yang et al. (2006) referente a expressão de VEGF após estímulo com norepinefrina em células de carcinoma nasofaríngeo. Por outro lado, a correlação na expressão do gene e da proteína de VEGF, sugerindo atividade transcricional na produção deste fator de crescimento, foi demonstrado por Guo et al. (2009) em câncer de pâncreas e por Park et al. (2011) em câncer de próstata, mama e carcinoma hepatocelular. Novamente, vale ressaltar que estes autores estudaram o fator de crescimento endotelial vascular do tipo A.

O efeito da norepinefrina, em condições que simulam o estresse, pode ser estimulatório na expressão de VEGF (tipo A) como foi observado em células de câncer de ovário (LUTGENDORF et al., 2003), em carcinoma nasofaríngeo (YANG et al., 2006), em câncer de pâncreas (GUO et al., 2009), em câncer de próstata, em câncer de mama e em carcinoma hepatocelular (PARK et al., 2011), ou inibitório

como descrito por Madden, Szpunar e Brown (2011) em linhagens de câncer de mama e na presente investigação.

Sendo este trabalho pioneiro na investigação da expressão gênica e proteica de VEGF-C após estímulo com norepinefrina, em carcinomas espinocelulares, inclusive naqueles de boca, outros ensaios experimentais serão necessários para confirmar estes resultados auxiliando na compreensão da modulação dos fatores angiogênicos, particularmente do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C, pelos neurohormônios do estresse.

7 – Conclusões

7 CONCLUSÕES

A análise da expressão gênica e protéica do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C (VEGF-C) em linhagens celulares de carcinomas espinocelulares de língua, estimuladas com norepinefrina e propranolol, permitiu verificar:

- um comportamento irregular na produção de RNAm para VEGF-C, com tendências a variações da expressão gênica (aumento e inibição) após estímulo com norepinefrina e propranolol;
- que o propranolol, inibidor inespecífico dos receptores β adrenérgicos, não diminuiu a expressão gênica celular de VEGF-C;
- que a produção de VEGF-C nos sobrenadantes das culturas de células malignas não refletiram a expressão gênica do VEGF-C;
- que a inibição significativa da produção de VEGF-C pelas células malignas ($p \leq 0,001$) somente ocorreu no ensaio de 24 horas após o estímulo com $10\mu\text{M}$ de norepinefrina na linhagem SCC-9.

Estes resultados sugerem que a expressão de VEGF-C nas linhagens de carcinomas espinocelulares humanos de boca, parece não ser mediado pela norepinefrina, via receptores beta-adrenérgicos.

Referências

REFERÊNCIAS

ACHEN, M. G.; MANN, G. B.; STACKER, S. A. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. **Br J Cancer**, v. 94, n. 10, p. 1355-60, May 2006.

ACHEN, M. G.; STACKER, S. A. Molecular control of lymphatic metastasis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1131, p. 225-34, 2008.

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

ARMAIZ-PENA, G. N. et al. Neuroendocrine modulation of cancer progression. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 1, p. 10-5, Jan. 2009.

ASANO, A.; IRIE, Y.; SAITO, M. Isoform-specific regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) family mRNA expression in cultured mouse brown adipocytes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 174, n. 1-2, p. 71-6, Mar. 2001.

BERNABÉ, D.G. **Evidências da associação entre hormônios do estresse e câncer de boca**. 2009. 115 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

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**, v. 25, n. 3, p. 574-83, Mar. 2011.

BIERHAUS, A. et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1920-5, Feb. 2003.

BOCK, J. M. et al. Modulation of cellular invasion by VEGF-C expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 134, n. 4, p. 355-62, Apr. 2008.

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**, v. 26, n. 26, p. 3777-88, May 2007.

CHAN, C.; LIN, H. J.; LIN, J. Stress-associated hormone, norepinephrine, increases proliferation and IL-6 levels of human pancreatic duct epithelial cells and can be inhibited by the dietary agent, sulforaphane. **Int J Oncol**, v. 33, n. 2, p. 415-9, Aug. 2008.

CHEN, G. et al. Vascular endothelial growth factor C: the predictor of early recurrence in patients with N2 non-small-cell lung cancer. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 37, n. 3, p. 546-51, Mar. 2010.

CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 7, p. 374-81, July 2009.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, n. 9, p. 1244-52, Mar. 1992.

DAAKA, Y.; LUTTRELL, L. M.; LEFKOWITZ, R. J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. **Nature**, v. 390, n. 6655, p. 88-91, Nov. 1997.

DAS, S.; SKOBE, M. Lymphatic vessel activation in cancer. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1131, p. 235-41, 2008.

FITZGERALD, P. J. Is norepinephrine an etiological factor in some types of cancer? **Int J Cancer**, v. 124, n. 2, p. 257-63, Jan. 2009.

FLINT, M. S. et al. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 470-9, June 2007.

FREDRIKSSON, J. M. et al. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta - adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. **J Biol Chem**, v. 275, n. 18, p. 13802-11, May 2000.

GUO, K. et al. Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. **Oncol Rep**, v. 22, n. 4, p. 825-30, Oct. 2009.

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

HIRAKAWA, S. et al. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1010-7, Feb. 2007.

JAKOBISIAK, M.; LASEK, W.; GOLAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunol Lett**, v. 90, n. 2-3, p. 103-22, Dec. 2003.

JOHNSON, M. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, n. 1, p. 18-24, Jan. 2006.

KAWAKAMI, M. et al. Quantification of vascular endothelial growth factor-C and its receptor-3 messenger RNA with real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of lymph node metastasis in human colorectal cancer. **Surgery**, v. 133, n. 3, p. 300-8, Mar. 2003.

KIMURA, H. et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) levels predict recurrence in patients with esophageal cancer. **Anticancer Res**, v. 28, n. 1A, p. 165-9, Jan/Feb. 2008.

LI, Q. L. et al. Expression and clinical significance of VEGF-C and Flt-4 in tongue squamous cell carcinoma. **Ai Zheng**, v. 25, n. 2, p. 235-40, Feb. 2006.

LIANG, X. et al. Effect of local hyperthermia on lymphangiogenic factors VEGF-C and -D in a nude mouse xenograft model of tongue squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 46, n. 2, p. 111-5, Feb. 2010.

LIU, H. et al. COX-2-mediated regulation of VEGF-C in association with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in lung cancer. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 293, n. 11, p. 1838-46, Nov. 2010.

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

LUTGENDORF, S. K. et al. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 12, p. 4514-21, Oct. 2003.

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**, Jan. 2011.

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

MATSUURA, M. et al. Autocrine loop between vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangiogenesis in oral squamoid cancer cells. **Am J Pathol**, v. 175, n. 4, p. 1709-21, Oct. 2009.

NAKAZATO, T. et al. Expression level of vascular endothelial growth factor-C and -A in cultured human oral squamous cell carcinoma correlates respectively with lymphatic metastasis and angiogenesis when transplanted into nude mouse oral cavity. **Oncol Rep**, v. 15, n. 4, p. 825-30, Apr. 2006.

NEUCHRIST, C. et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Head Neck**, v. 25, n. 6, p. 464-74, June 2003.

NICOSIA, R. F. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? **Am J Pathol**, v. 153, n. 1, p. 11-6, July 1998.

P, O. C.; RHYS-EVANS, P.; ECCLES, S. A. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. **Cancer**, v. 92, n. 3, p. 556-68, Aug. 2001.

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

PIMENTA AMARAL, T. M. et al. Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. **Oral Oncol**, v. 40, n. 8, p. 780-6, Sep. 2004.

LUTGENDORF, S. K. et al. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 12, p. 4514-21, Oct. 2003.

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**, Jan. 2011.

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

MATSUURA, M. et al. Autocrine loop between vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangiogenesis in oral squamoid cancer cells. **Am J Pathol**, v. 175, n. 4, p. 1709-21, Oct. 2009.

NAKAZATO, T. et al. Expression level of vascular endothelial growth factor-C and -A in cultured human oral squamous cell carcinoma correlates respectively with lymphatic metastasis and angiogenesis when transplanted into nude mouse oral cavity. **Oncol Rep**, v. 15, n. 4, p. 825-30, Apr. 2006.

NEUCHRIST, C. et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Head Neck**, v. 25, n. 6, p. 464-74, June 2003.

NICOSIA, R. F. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? **Am J Pathol**, v. 153, n. 1, p. 11-6, July 1998.

P, O. C.; RHYS-EVANS, P.; ECCLES, S. A. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. **Cancer**, v. 92, n. 3, p. 556-68, Aug. 2001.

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

PIMENTA AMARAL, T. M. et al. Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. **Oral Oncol**, v. 40, n. 8, p. 780-6, Sep. 2004.

REICHE, E. M.; NUNES, S. O.; MORIMOTO, H. K. Stress, depression, the immune system, and cancer. **Lancet Oncol**, v. 5, n. 10, p. 617-25, Oct. 2004.

SASAHIRA, T. et al. MIA-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 12, p. 2285-94, Aug. 2010.

SCHULLER, H. M. Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis. **Prog Exp Tumor Res**, v. 39, p. 45-63, 2007.

SCHULLER, H. M. Neurotransmission and cancer: implications for prevention and therapy. **Anticancer Drugs**, v. 19, n. 7, p. 655-71, Aug. 2008.

SHAHZAD, M. M. et al. Stress effects on FosB- and interleukin-8 (IL8)-driven ovarian cancer growth and metastasis. **J Biol Chem**, v. 285, n. 46, p. 35462-70, Nov. 2010.

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

SHERMAN, D. K. et al. Psychological vulnerability and stress: the effects of self-affirmation on sympathetic nervous system responses to naturalistic stressors. **Health Psychol**, v. 28, n. 5, p. 554-62, Sep. 2009.

SIRIWARDENA, B. S. et al. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. **J Clin Pathol**, v. 61, n. 1, p. 103-8, Jan 2008.

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

SU, J. L. et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. **Br J Cancer**, v. 96, n. 4, p. 541-5, Feb. 2007.

SUGIURA, T. et al. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. **Int J Oncol**, v. 34, n. 3, p. 673-80, Mar. 2009.

TANAKA, T. et al. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in esophageal cancer correlates with lymph node metastasis and poor patient prognosis. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 29, p. 83, 2010.

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

TILAN, J.; KITLINSKA, J. Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis-Link between Stress and Cancer Progression. **J Oncol**, v. 2010, p. 1-6, 2010.

WARBURTON, G. et al. Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 3, p. 475-84, Mar. 2007.

YANG, E. V. et al. VEGF is differentially regulated in multiple myeloma-derived cell lines by norepinephrine. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 3, p. 318-23, Mar. 2008.

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**, 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**, v. 66, n. 21, p. 10357-64, Nov. 2006.

YAO, H. et al. Adrenaline induces chemoresistance in HT-29 colon adenocarcinoma cells. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 190, n. 2, p. 81-7, Apr. 2009.

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**, v. 38, n. 1, p. 94-100, Jan. 2009.

Anexo

ANEXO A – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 068/2010

Bauru, 28 de maio de 2010.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Modulação da expressão de VEGF-C por mediador relacionado ao estresse em cultura de carcinomas espinocelulares de boca"**, de autoria de Bruna Maria Rodrigues Vilardi, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 26 de maio de 2010 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta

Coordenadora

Profª Drª Denise Tostes Oliveira

Docente do Departamento de Estomatologia