

4.02.01 - Odontologia / Clínica Odontológica

DELEÇÃO DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINA ACKR2 NÃO MODIFICA A CARCINOGENESE ORAL EXPERIMENTAL

Ana Laura Fernandes de Oliveira^{1*}, Janine Mayra da Silva², Tálita Pollyanna Moreira dos Santos³, Remo de Castro Russo⁴, Adriana Machado Saraiva², Gustavo Pompermaier Garlet⁵, Tarcília Aparecida da Silva⁶

1. Estudante de IC da Faculdade de Odontologia da UFMG

2. Departamento de Clínica, Cirurgia e Patologia, Faculdade de Odontologia, UFMG

3. Departamento de Análises Clínicas, Toxicologia e Ciências Alimentares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto

4. Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

5. Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia, USP, Bauru

6. Departamento de Clínica, Cirurgia e Patologia, Faculdade de Odontologia, UFMG / Orientadora

Resumo:

O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 controla a biodisponibilidade dessas moléculas no microambiente tumoral. O estudo visa avaliar os efeitos da deleção do ACKR2 na carcinogênese oral. Animais WT e ACKR2^{-/-} ingeriram o carcinógeno 4NQO na água de beber por 28 semanas. As línguas foram obtidas para análise de macro e microscopia, expressão de quimiocinas, receptores, citocinas, fatores angiogênicos, moléculas de adesão e componentes de matriz extracelular. Os resultados revelam incidência similar de lesões histopatologicamente semelhantes de carcinoma de células escamosas nos animais WT e ACKR2^{-/-}. A expressão das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CC12 e dos receptores CCR1, CCR2 e CCR5 foi aumentada em ambos os grupos. Não houve diferença significativa no recrutamento de eosinófilos intratumorais. Todavia, as lesões de CCE nos ACKR2^{-/-} expressaram mais CCL2, IL-6, e IL-7. Os resultados sugerem que ACKR2^{-/-} não altera o curso da carcinogênese oral induzida em camundongos.

Autorização legal: Protocolo CETEA: 12/2011

Palavras-chave: ACKR2; CCEB; Quimiocinas.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPEMIG

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFMG

Introdução:

O Carcinoma de Células Escamosas de Boca (CCEB) é, atualmente, a neoplasia mais comum dentre as neoplasias que acometem a boca. Considerado altamente infiltrativo, localmente agressivo e propenso a metástases linfonoidais, a sobrevida média dos pacientes acometidos por esta enfermidade é de aproximadamente 5 anos.

O comportamento tumoral depende da capacidade das células malignas de se relacionarem com o microambiente tumoral, de forma a desenvolver mecanismos de sobrevivência, tais como a produção de fatores angiogênicos, integrinas, proteases, citocinas e quimiocinas. A atividade pró-tumoral das quimiocinas está envolvida com a indução do tráfego de células inflamatórias, motilidade das células neoplásicas, neovascularização e com a remodelação da matriz extracelular. Alguns estudos demonstraram que as quimiocinas CC, tais como CCL2, CCL5, CCL7, CCL21, e seus receptores apresentam efeitos pró-tumorigênicos *in vitro* e/ou *in vivo*. Em se tratando do CCEB, foram detectados níveis aumentados dessas quimiocinas em biópsias de pacientes acometidos e, também, em lesões quimicamente induzidas em camundongos.

A biodisponibilidade dessas moléculas no microambiente tumoral pode ser regulada por receptores atípicos de quimiocinas, como o ACKR2 (previamente conhecido como D6), que atuam regulando a resposta inflamatória associada ao tumor *in vivo*. Os efeitos protetores do ACKR2 foram demonstrados em Sarcomas de Kaposi, tumores de pele

quimicamente induzidos, câncer de mama e em adenocarcinomas de colon. Até o momento, não foram desenvolvidos estudos focados no papel do ACKR2 no câncer de boca. Dessa forma, o presente estudo objetiva investigar o papel deste receptor atípico na tumorigênese oral empregando um modelo de carcinoma de células escamosas quimicamente induzido em camundongos.

Metodologia:

Neste trabalho, as funções do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 foram avaliadas usando um modelo murino de indução química de carcinogênese em tecido lingual, com 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO). Foram selecionados seis grupos experimentais, sendo eles WT e ACKR2^{-/-}, recebendo diferentes concentrações do carcinógeno, seguidos dos seus respectivos grupos controle (protocolo CETEA: 12/2011).

A indução foi realizada utilizando-se o carcinógeno 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) diluído semanalmente nas concentrações de 50µg/mL e 200µg/mL na água de beber dos animais. Os animais em tratamento (n= 5 por grupo) receberam o 4NQO diariamente durante o período de 28 semanas. Os animais controle receberam água filtrada durante o mesmo período. Após 28 semanas, os animais foram eutanasiados para a coleta dos seguintes órgãos e tecidos para microscopia: língua, linfonodos cervicais, pulmões, fígado, estômago, duodeno, jejuno, íleo, e intestino grosso. As línguas foram fotografadas para análise macroscópica. Todos os órgãos foram fixados e cortados para coloração H&E.

A análise histopatológica das línguas foi realizada por dois operadores calibrados e cegos diante do *status* dos grupos, caracterizando as lesões encontradas em *scores* iguais a 0 (epitélio normal), 1 (displasia leve), 2 (displasia moderada), 3 (displasia severa), 4 (carcinoma *in situ*) e 5 (carcinoma invasivo). Foram considerados os 10 campos mais representativos de cada lesão. Os demais órgãos foram analisados por um patologista geral para avaliar os possíveis efeitos do 4NQO nesses sítios distantes.

A técnica imunohistoquímica foi realizada em 5 lâminas por grupo, utilizando o marcador de proliferação celular Ki67 por meio do método da estreptavidina-biotina. Pelo menos um corte por lâmina foi utilizado como marcador negativo, no qual o anticorpo primário foi omitido utilizando-se PBS-BSA 0,1%. As células imunomarcadas foram

contadas no aumento de 1000x, em 20 campos consecutivos. Os resultados foram expressos como o total de células Ki67⁺ em todas as camadas epiteliais, por campo.

Reações de *Real Time PCR* foram realizadas utilizando RNA total obtido de amostras de línguas (n=4 por grupo) normais e com lesões de CCE, a partir do kit RNeasyFFPE (Qiagen Inc). O DNA complementar foi sintetizado por meio de reação da transcriptase reversa (*Superscript III*, Invitrogen). Em seguida, foi utilizado um painel contendo os alvos "*Wound Healing*" (PAMM-012) e "*Inflammatory cytokines and receptors*" (PAMM-011). Os dados foram analisados por um software online (SABiosciences), e os resultados expressos pela normalização dos dados geométricos dos seguintes genes constitutivos: GAPDH, ACTB, Hprt1 e subsequentemente normalizados pelo grupo controle.

Finalmente, eosinófilos foram corados pela técnica de coloração Sirius Red, e então contados seguindo-se 20 campos consecutivos no tecido epitelial, no aumento de 400x. Os resultados foram expressos como o total de eosinófilos por amostra.

Resultados e Discussão:

A análise clínica das lesões de CCEB revelou aparente similaridade nos tumores induzidos pelo 4NQO tanto na concentração de 50µg/mL, quanto na de 200µg/mL. Não foram encontradas alterações macroscópicas nas amostras de língua dos grupos controle. A análise microscópica foi consistente com os achados clínicos sendo que os resultados obtidos demonstraram acentuada atipia citomorfológica e *scores* histopatológicos de displasia epitelial semelhantes nos grupos WT e ACKR2^{-/-} tratados.

A análise da imunomarcagem por Ki67 revelou uma porcentagem significativamente aumentada de queratinócitos Ki67⁺ em todos os grupos tratados, em comparação com os respectivos grupos controle. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos WT e ACKR2^{-/-} tratados nas diferentes doses testadas.

A análise da expressão de quimiocinas CC e seus receptores revelou um importante aumento das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL12, CCR1, CCR2 e CCR5 nos grupos WT e ACKR2^{-/-} tratados (dose 50µg/mL) em comparação aos grupos controle. Não houve diferença significativa na

expressão dessas moléculas comparando-se WT a ACKR2^{-/-}. Por outro lado, a expressão de *IL-6* e *IL-17* foi significativamente maior no grupo ACKR2^{-/-} tratado em comparação ao grupo WT tratado. As expressões de fatores angiogênicos, moléculas de adesão celular e de metaloproteinases de matriz foram similares para os grupos tratados.

A quantificação de eosinófilos nos sítios tumorais, para as duas concentrações de 4-NQO utilizadas, revelou um aumento no número de células Sírius Red positivas em ambos os grupos tratados em relação aos respectivos controles. Contudo, não houve diferença significativa comparando-se os grupos tratados.

Conclusões:

Os resultados obtidos sugerem que a deleção do receptor ACKR2 não modificou o curso da carcinogênese oral quimicamente induzida em camundongos nas condições analisadas.

Referências bibliográficas

Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer* 2013;4:66-83. doi: 10.7150/jca.5112.

Langenes V, Svensson H, Börjesson L, Gustavsson B, Bemark M, Sjöling A, et al. Expression of the chemokine decoy receptor D6 is decreased in colon adenocarcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:1687-95. doi: 10.1007/s00262-013-1472-0.

Li J, Liang F, Yu D, Qing H, Yang Y. Development of a 4-nitroquinoline-1-oxide model of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2013;49:299-305. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.10.013.

Nibbs RJ, Gilchrist DS, King V, Ferra A, Farrow S, Hunter KD, et al. The atypical chemokine receptor D6 suppresses the development of chemically induced skin tumors. *J Clin Invest* 2007;117:1884-92. doi:10.1172/JCI30068.

Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral Cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen treated mice. *Clin Canc Res* 2004;10:301-313.

Wu FY, Ou ZL, Feng LY, Luo JM, Wang LP, Shen ZZ, et al. Chemokine decoy receptor d6 plays a negative role in human breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2008 Aug;6(8):1276-88. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2108.