



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA
MESTRADO PROFISSIONAL

MÁRCIA GONÇALVES

**AÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEOS NA VIABILIDADE E
PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE
CÂNCER DE BOCA E ESÔFAGO**

Porto Alegre

2015

MÁRCIA GONÇALVES

**AÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEOS NA VIABILIDADE E
PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE
CÂNCER DE BOCA E ESÔFAGO**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação Mestrado Profissional em
Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de
Farmácia

Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Bueno Morrone
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Duarte de Souza

Porto Alegre

2015

MÁRCIA GONÇALVES

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia em Mestrado
Profissional Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Daniela Marti Barros - FURG

Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior- PUCRS

Prof. Dr. Pablo Machado - PUCRS

Porto Alegre
2015

Dedico esse trabalho ao meu noivo e companheiro
de todas as horas, Pedro, aos meus pais
e ao meu irmão, pelo apoio, incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

A Empresa AGT do TECNOPUC pela oportunidade de continuar estudando, me proporcionando uma bolsa de estudos.

A Professora Doutora Fernanda Bueno Morrone pela orientação, paciência, ensinamentos e correção do artigo.

A Professora Doutora Ana Paula Duarte de Souza pelos ensinamentos, por toda ajuda e exemplo profissional.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultura de Células – Farmacologia e do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, em especial: A Angélica, André, Bianca, Fernanda M., Fernanda, Krist, Marina, Natália e Tânia por facilitarem meu trabalho, sempre dispostos a me ajudarem.

RESUMO

Os tumores de esôfago e de boca estão classificados como as neoplasias malignas mais frequentes no Brasil. O câncer de esôfago é o oitavo mais comum no mundo e o câncer de boca é classificado como o 5º dentre as neoplasias malignas que afetam o homem no Brasil. Os lipopolissacáridos (LPS) são compostos característicos da parede celular de bactérias gram-negativas. Eles são capazes de regular a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, através da ligação ao receptor *toll-like* 4 (TLR4) via NF-κB. Estudos recentes mostram que o LPS pode aumentar a habilidade de migração de linhagens celulares de câncer de esôfago humano HKESC-2 através do aumento de suas propriedades de adesão. Entretanto, ainda não foi testado o efeito do LPS sobre as células de câncer de esôfago e de carcinoma oral humano HN30. Deste modo, este estudo teve como objetivo determinar a ação dos compostos de LPS (derivado de bactérias) sobre a proliferação e viabilidade de linhagens celulares de câncer de esôfago humano, e de carcinoma oral humano. Foram utilizados como tratamento o LPS para as linhagens OE19 e OE21 e o PgLPS (lipopolissacarídeo da *Porphyromonas gingivalis*) para a linhagem HN30. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio MTT e contagem celular. Também foi avaliada a expressão do receptor TLR4 por PCR em tempo real. LPS em concentrações mais elevadas reduziu significativamente a viabilidade celular em ambas as linhagens celulares de câncer de esôfago, o adenocarcinoma (OE19) e o carcinoma de células escamosas (OE21) em diferentes tempos de tratamento. Além disso, ambas as linhagens celulares, OE19 e OE21, expressaram o receptor TLR4. Avaliados em conjunto, os nossos dados demonstram que o LPS em concentrações elevadas pode contribuir para a morte tumoral, de acordo com dados prévios.

Palavras-chave: LPS, câncer de boca, câncer de esôfago, TLR4.

ABSTRACT

The esophageal and oral tumors are classified as the most frequent malignancies in Brazil. Esophageal cancer is the eighth most common in the world and oral cancer is ranked as the 5th among malignant neoplasms affecting man in Brazil. The lipopolysaccharide (LPS) are characteristic compounds of the cell wall of gram-negative bacteria. They are able to regulate gene expression of pro-inflammatory cytokines by binding to toll-like receptor 4 (TLR4) via NF- κ B pathway. Recent studies show that LPS can increase the migration ability of cell lines of human esophageal cancer HKESC-2 by increasing its binding properties. In the meantime, it has not been tested the effect of LPS on esophageal cancer cells OE19 and OE21 and human oral carcinoma HN30. Thus, this study aimed to determine the action of LPS compounds on the proliferation and viability of cell lines of human esophageal cancer and human oral carcinoma HN30. Were used as treatment LPS for OE19 and OE21 cell lines and the PgLPS (lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*) for HN30 cell line. Cell viability was assessed using the MTT assay and cell counting. The TLR4 expression by real-time PCR was also evaluated. LPS at higher concentrations decreased significantly cell viability in both cell lines, adenocarcinoma (OE19) and squamous esophageal carcinoma (OE21) at different times of treatment. In addition, both cell lines, OE19 and OE21, expressed TLR4 receptor. Taken together, our data demonstrated that LPS at high concentrations might contribute to tumor death, in agreement with previously data.

Key words: LPS, oral cancer, esophageal cancer, TLR4.

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
COX-2 - Ciclo-oxigenase-2
CpG-ODN - Dinucleotideo citosina-fosfato-guanosina não metilado
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EUA – Estados Unidos da América
FBS – Soro Fetal Bovino
FDA – Food and Drug Administration
IgG – Imunoglobulina G
IL-1 β - Interleucina 1 β
IL-6 – Interleucina 6
LPS – Lipopolissacarídeo
MTT - Brometo de Tiazol Azul de Tetrazolio - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
PBMC - Células mononucleares do sangue periférico
PgLPS - Lipopolissacarídeo da *Porphyromonas gingivalis*
qRT-PCR - Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
RNA - Ácido ribonucleico
ROS - Espécies reativas de oxigênio
TLR2 - Receptor *Toll-like 2*
TLR4 – Receptor *Toll-like 4*
TLR9 - Receptor *Toll-like 9*
TNF - Fator de Necrose Tumoral
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estimativas sobre o Câncer de Esôfago no Mundo (Homens).....	12
Figura 2. Estimativas sobre o Câncer de Esôfago no Mundo (Mulheres)	12
Figura 3. Distribuição no Brasil dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo.....	14
Figura 4. Ativação hipotética da via NF- κ B no esôfago	16
Figura 5. Papel dos receptores Toll-like no câncer de esôfago	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO	10
1.2 CÂNCER DE BOCA	13
1.3 BIOTECNOLOGIA	14
1.4 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)	15
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 ARTIGO CIENTÍFICO “EFFECT OF LPS ON THE VIABILITY AND PROLIFERATION OF HUMAN ORAL AND ESOPHAGEAL CANCER CELL LINES”	22
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
5 PERSPECTIVAS	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO

O câncer de esôfago é o oitavo mais comum no mundo, com mais de 480.000 novos casos anuais, e é responsável por mais de 400.000 mortes, tornando-o a sexta causa de morte por câncer (Tarapore *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos estima-se que existam 18.170 novos casos e 15.450 mortes de câncer de esôfago em 2014 (National Cancer Institute, 2014).

No Brasil, a incidência de câncer de esôfago varia de 1 a 18 por 100.000 habitantes, e é maior na região sul do país. Fatores de risco, tais como consumo de álcool, fumo, deficiências nutricionais, alimentação, ingestão de líquidos quentes e exposição ocupacional estão envolvidos com o aparecimento de tumores esofágicos (Mota *et al.*, 2013). O prognóstico é baixo, com uma taxa de sobrevida de 15% em 5 anos. Se o diagnóstico ocorrer cedo, o prognóstico é significativamente melhor, com índice de sobrevida de 95% em 5 anos (Arantes *et al.*, 2012).

O tratamento para o câncer de esôfago muitas vezes inclui radioterapia associada ou não a cirurgia. A maior parte dos tumores subepiteliais gástricos e de esôfago são benignos, mas a possibilidade de transformação para malignidade é grande, especialmente quando os tumores subepiteliais se originam a partir da camada muscular (Zhou *et al.*, 2015)

Os dois principais tipos histológicos de câncer de esôfago são adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas, que se diferenciam de acordo com seus fatores de risco e distribuições demográficas. O câncer de células escamosas, que surge das células que limitam a parte superior do esôfago e o adenocarcinoma. O outro subtipo é o adenocarcinoma, que geralmente está associado com refluxo gastroesofágico e esôfago de Barrett, que surge de células glandulares que estão presentes na junção do esôfago e estômago (Ma *et al.*, 2012). O esôfago de Barrett é caracterizado pela substituição do epitélio escamoso normal do esôfago pelo epitélio colunar metaplásico como um resultado do refluxo gastroesofágico crônico (Merchant *et al.*, 2013). O carcinoma de células escamosas do esôfago é um dos tumores

malignos mais agressivos do mundo e a angiogênese é uma importante característica clínica do mesmo. Ele apresenta um prognóstico muito ruim, porque muitos casos são assintomáticos, até que a doença esteja em estágio avançado (Xu *et al.* 2014).

Embora o adenocarcinoma tenha sido o subtipo mais frequente em homens brancos nos Estados Unidos desde o começo dos anos 90, o carcinoma de células escamosas continua sendo o subtipo mais prevalente no mundo, principalmente na China e em outros países asiáticos (Almodova *et al.*, 2013). As figuras 1 e 2, adaptadas de WHO (2012), apresentam as estimativas sobre o câncer de esôfago no mundo em relação a homens e mulheres. De fato, este tipo de câncer de esôfago é um dos carcinomas mais agressivos do trato gastrointestinal (Ren *et al.*, 2013). O fumo e o consumo excessivo de álcool contribuem para cerca de 90% do total de casos de carcinoma de células escamosas. Já para o adenocarcinoma, o fumo, a obesidade e o refluxo gastroesofágico são os principais fatores de risco (Thakur *et al.*, 2013). O estudo realizado por Steffen *et al.* (2015) demonstrou que a obesidade abdominal é um fator de risco indiscutível para adenocarcinoma de esôfago e também fornece evidências para um efeito protetor do tecido adiposo no adenocarcinoma de esôfago (Steffen *et al.*, 2015).

O carcinoma de células escamosas é mais prevalente na China e em outros países asiáticos (Ren *et al.*, 2013).

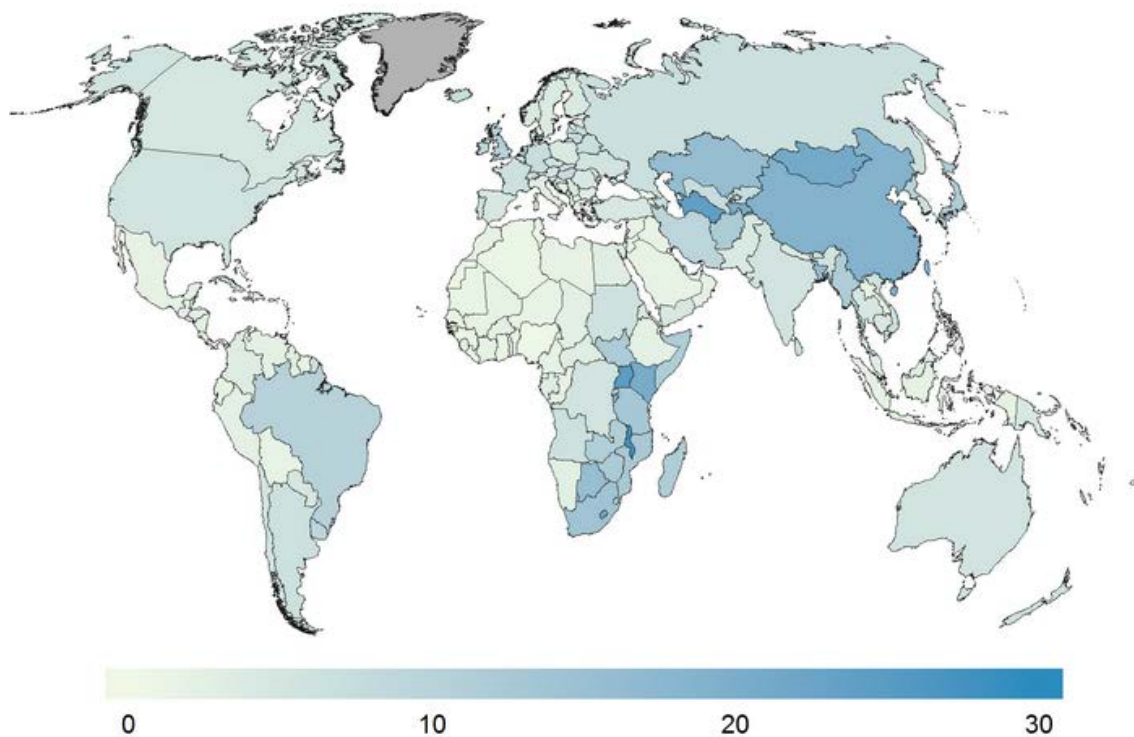


Figura 1 – Estimativa sobre o Câncer de Esôfago em Homens por 100.000 habitantes. (WHO, 2012)

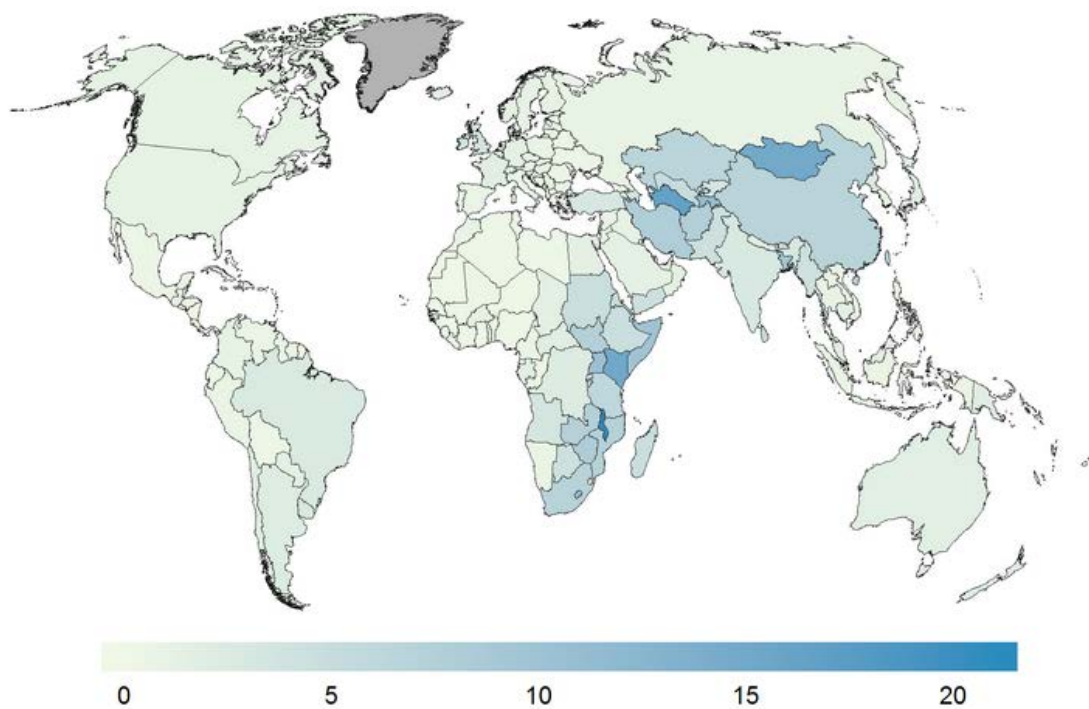


Figura 2 – Estimativa sobre o Câncer de Esôfago em Mulheres por 100.000 habitantes. (WHO, 2012)

1.2 CÂNCER DE BOCA



Neoplasias malignas da cavidade oral têm uma alta taxa de mortalidade. Por esta razão, as campanhas preventivas têm sido desenvolvidas, tanto para educar a população como para diagnosticar lesões em uma fase inicial (Nemoto *et al.*, 2014). O câncer de boca é classificado como o 5º entre as neoplasias malignas que afetam o homem no Brasil. Nas últimas décadas os índices de incidência e o número de mortes causadas por esta doença aumentaram consideravelmente (Girardi *et al.*, 2013). O câncer da mucosa oral representa aproximadamente 1 a 2% de todos os cânceres (Waal, 2013). Na Índia, o câncer de boca é o principal tipo de câncer e é responsável por 50-70% de todos os cânceres diagnosticados quando comparado a 2-3% no Reino Unido e EUA. Mais de 80% dos pacientes com câncer nos países em desenvolvimento são diagnosticados em estágio avançado e não tem acesso à detecção precoce (Deshpande *et al.*, 2014). Em um estudo realizado na Alemanha por Jansen *et al.* (2014), foi observado que embora as estimativas de sobrevida sejam muito menores para os pacientes idosos, não se observam diferenças entre faixas etárias para alguns tipos de câncer (Jansen *et al.*, 2014). As melhorias relatadas com relação a sobrevivência podem refletir os avanços na qualidade do tratamento e diagnóstico do câncer. A figura 3 mostra a distribuição de câncer no Brasil em 2014 com especial ênfase para o câncer oral e de esôfago (INCA, 2014).

A grande maioria destas neoplasias consiste de carcinomas de células escamosas. Os tipos de câncer oral incluem tumores malignos da glândula salivar, sarcoma de tecidos moles e ossos da mandíbula, melanoma, tumores odontogênicos malignos, malignidades linforeticulares, e metástases de tumores localizados em qualquer parte do corpo (Waal, 2013).

O carcinoma oral de células escamosas é considerado um problema de saúde pública, e a morbidade e mortalidade associadas com este tumor permanecem elevadas. O tratamento padrão para estes casos incluem cirurgia e radioterapia; a quimioterapia pode ser usada em casos avançados ou como tratamento paliativo. É comum que estes protocolos apresentem impactos funcionais e estéticos significativos no estilo de vida dos pacientes (Romanini *et al.*, 2012). Hassona e colaboradores (2014) demonstraram que apenas 45,6%

dos indivíduos tinham algum conhecimento sobre o câncer bucal. Somente 66,9% e 33,8% dos indivíduos foram capazes de identificar de forma correta o tabaco e o álcool, respectivamente, como fatores de risco. Cerca de 24% dos avaliados não tinham conhecimento sobre quaisquer sinais que pudessem indicar o câncer bucal (Hassona *et al.*, 2014).

As principais etiologias do câncer de boca incluem o fumo, consumo de álcool e o hábito de mascar *betel quid* (tipo de folha consumida tipicamente na Ásia que possui propriedades psico-estimulantes). É predominante em homens, enquanto que a incidência em mulheres é relativamente baixa (Chen *et al.*, 2013). A mortalidade por câncer da cavidade bucal é alta, apresentando estimativa recente de 128.000 mortes por ano no mundo (Toporcov *et al.*, 2012). Metástases em nodos linfáticos da região cervical são a principal característica associada com a agressividade do tumor em carcinomas orais de células escamosas, reduzindo a sobrevida de 5 anos para cerca de 50%. Para estes pacientes, a intensificação do tratamento com radioterapia e quimioterapia resulta em melhora da sobrevida. Entretanto, a toxicidade destes tratamentos pode ser elevada, geralmente resultando em prejuízos na fala e na deglutição (Xu *et al.*, 2013).

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%		
Próstata	68.800	22,8%	Homens		Mama Feminina	57.120	20,8%		
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Mulheres		Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%					Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%					Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%					Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%					Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%					Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%					Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%					Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%					Leucemias	4.320	1,6%

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Figura 3 – Distribuição proporcional no Brasil dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo. (INCA, 2014)

1.3 BIOTECNOLOGIA

Os biofármacos são indispensáveis na medicina moderna. O valor de mercado estimado é de 70 a 80 bilhões de dólares e taxas de crescimento anual entre 7 e 15% são esperadas. Estas são razões fortes para o foco da Farmácia e da Biotecnologia no desenvolvimento de biofármacos. Por definição o termo biofármaco refere-se a proteínas terapêuticas recombinantes e produtos

baseados em ácidos nucleicos. Anticorpos representam o maior grupo de proteínas utilizadas como biofármacos (Vogl, Hartner, Glieder, 2013). O aumento da heterogeneidade dos tumores e a interação tumor-hospedeiro tem estimulado o interesse no desenvolvimento de novas terapias que têm como alvo tanto as células tumorais como o microambiente do tumor (Xu *et al.*, 2014).

Hoje no Brasil a política pró-inovação, associada ao desenvolvimento produtivo e social, está sendo revigorada. Nas políticas recentes voltadas para o estímulo à produção e à inovação, a biotecnologia aparece como uma área chave para a transformação da capacidade produtiva e a satisfação das necessidades sociais (Bianchi, 2012). Desde o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, nos anos de 1980, é crescente o número de novas moléculas de origem biotecnológica estudadas, como proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e ácidos nucleicos, que apresentam um alto potencial terapêutico (Bianchi, 2012).

Mais de 125 produtos biotecnológicos já haviam sido aprovados para uso clínico pelo Food and Drug Administration (FDA) até o ano de 2006. No relatório da *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America* de 2006, estão descritas mais de 418 novas substâncias biotecnológicas identificadas para o tratamento de mais de 100 doenças que se encontram em estudos clínicos. Estas doenças incluem, principalmente, o câncer, as doenças infecciosas, as autoimunes e a AIDS (Melo *et al.*, 2012). Os Lipopolissacarídeos (LPS) são exemplos de compostos biotecnológicos.

1.4 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

Lipopolissacarídeos (LPS) são compostos característicos da parede celular de bactérias gram-negativas. São capazes de regular a expressão gênica de citocinas pro-inflamatórias através da ativação de NF- κ B via ligação ao receptor *toll-like 4* (TLR4). O impacto potencial do LPS no refluxo esofágico pode ocorrer através do relaxamento do esfíncter inferior do esôfago por síntese de óxido nítrico e por retardo de esvaziamento gástrico via cicloxigenase 2. A inflamação crônica pode ter um papel crítico na progressão de tumor de esôfago benigno para maligno (Yang *et al.*, 2012). A figura 4 demonstra uma via hipotética de ativação de NF- κ B no esôfago através da ligação do LPS ao

TLR4. O TLR4 é um receptor de padrão molecular da resposta imune inata (Yan *et al.*, 2015). A sinalização via TLR4 pode estar relacionada com a invasão celular, sobrevivência e metástases em uma variedade de cânceres (Yang *et al.*, 2014).

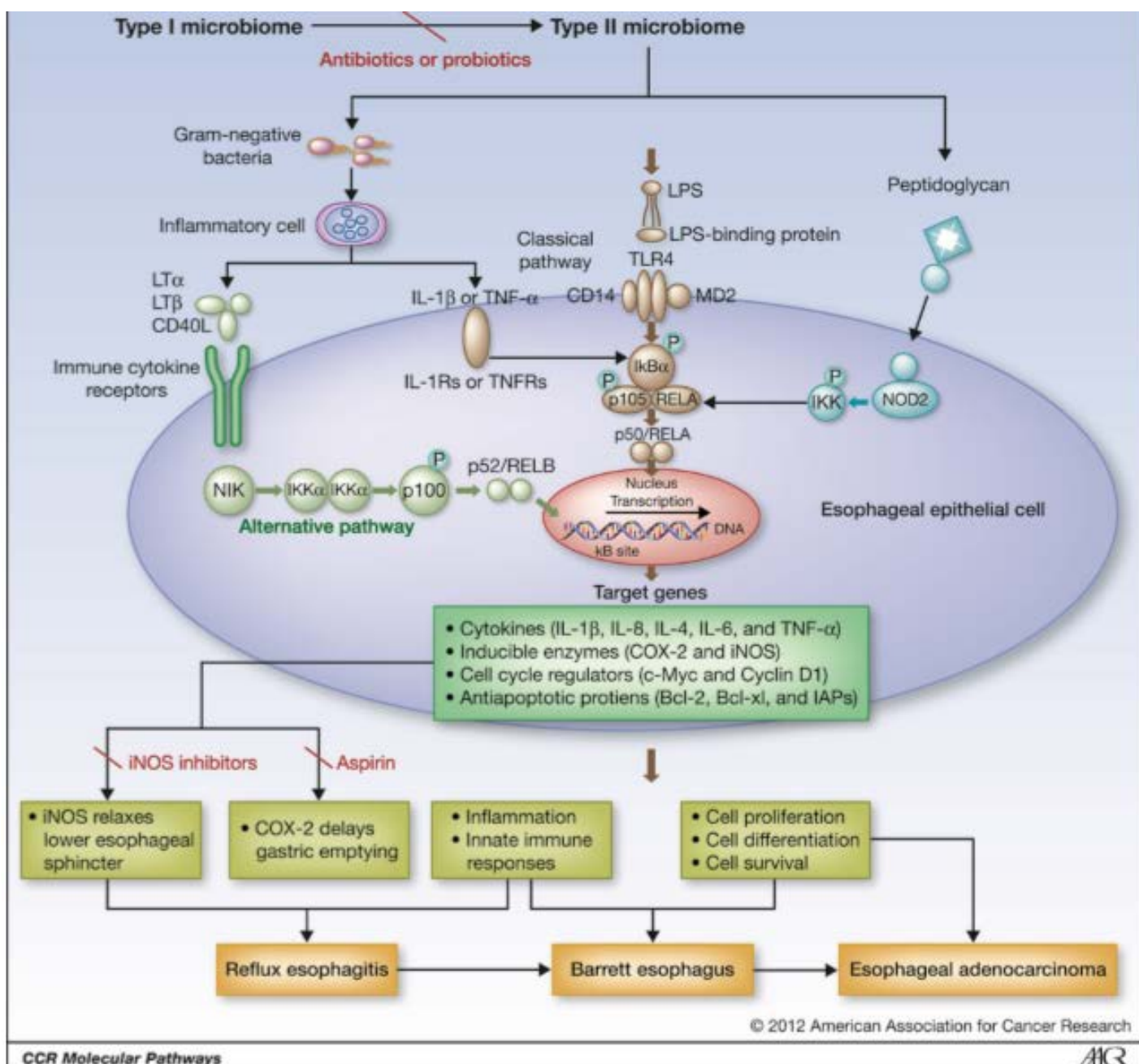


Figura 4 – Ativação hipotética da via NF- κ B no esôfago.
(Yang *et al.* 2012)

O LPS é o maior fator patogênico na sepse gram-negativa, que é caracterizada por choque, coagulopatia e disfunção em múltiplos órgãos. Em resposta a exposição sistêmica de LPS, citocinas pró-inflamatórias tais como Fator de Necrose Tumoral (TNF), interleucina (IL)-1 β e Interferon- γ são produzidas pelo hospedeiro. Foi evidenciado através de modelos animais que a administração de LPS induz apoptose de células brônquicas epiteliais no pulmão, após duas horas de tratamento. Esta observação foi confirmada por análise morfológica e sugere que este composto apresenta uma função direta no controle da apoptose neste tipo de tecido.

Evidências recentes demonstraram metástase aumentada de células de câncer de pulmão induzida por LPS, o que refletiu em um importante papel da inflamação na progressão do tumor. O receptor TLR4 possui um papel chave na investigação já que estudos recentes mostraram que o LPS e a estimulação deste receptor poderiam aumentar as metástases, como no caso de carcinoma papilar da tiróide, câncer colorectal, câncer de mama e células de carcinoma hepatocelular humano. A estimulação de TLR4 com LPS poderia também promover a migração e a invasão de células de câncer de pulmão (Liu *et al.*, 2015).

Recentemente, se observa um interesse crescente nas funções anti-tumorais iniciadas pela resposta imune inata. O papel dos receptores toll-like (TLRs), conforme demonstrado na Figura 5, e sua sinalização em tumor de escape imunológico e resistência à apoptose, por exemplo, está entre as fronteiras da exploração. TLRs são proteínas transmembranas do tipo I com domínios extracelulares constituídas em grande parte de repetições ricas em leucina e domínios de sinalização intracelulares que desempenham um papel crucial na inflamação e na defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores através do reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogênicos, tais como LPS, RNA, e DNA bacteriano. Estudos mais recentes têm demonstrado a expressão de TLRs em uma ampla variedade de tecidos tumorais. As vias de sinalização ativadas em células malignas podem ter consequências profundas para o crescimento de tumores através da promoção da progressão do câncer, a atividade anti-apoptótica, e resistência à resposta imune do (Sun *et al.*, 2012).

O sistema respiratório é continuamente exposto a baixos níveis de LPS, que está presente como um contaminante em partículas do ar, incluindo a poluição atmosférica, lixo orgânico e fumaça do cigarro. A exposição a altos níveis de LPS, por exemplo, em agricultores ou fumantes compulsivos, é conhecida por provocar inflamação aguda do pulmão, parcialmente iniciada por indução endógena antecipada de IL-1 β e TNF no pulmão (Vernooy *et al.*, 2001). O LPS estimula a permeabilidade vascular, promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como factor de necrose tumoral (TNF) e interleucina-6 (IL-6) a partir do sangue para os tecidos pulmonares e ativa numerosas células inflamatórias tais como neutrófilos e macrófagos. Em macrófagos, a indução de LPS ativa a transcrição de genes que codificam as proteínas pró-inflamatórias, o que leva à libertação de citocinas e a síntese de enzimas, tais como ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (Niu *et al.*, 2015).

Estudos recentes mostram que o LPS pode aumentar a habilidade de migração de células humanas de câncer de esôfago HKESC-2 através do aumento de suas propriedades de adesão por sinalização via TLR4 (Rousseau *et al.*, 2013). Alguns autores mencionam que a exposição ao LPS pode ter efeitos opostos na adesão das células tumorais e no desenvolvimento do tumor. Primeiro, por ligação ao TLR4, o LPS induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos, danificando o endotélio e promovendo a exposição da matriz extracelular endotelial, a qual células tumorais circulantes podem aderir. Segundo, o LPS pode estimular o *clearance* de células tumorais imunogênicas promovendo respostas imune adaptativas (Gül *et al.*, 2012).

O TLR4 é um dos receptores de membrana mais importantes envolvidos no processo de reconhecimento do LPS pelo hospedeiro. A estrutura do LPS da *Porphyromonas gingivalis* (PgLPS) apresenta uma porção antigênica e particular adicional e é reconhecida pelo receptor TLR2, que é responsável pelo reconhecimento dos componentes da parede celular de bactérias gram positiva (Sipert *et al.*, 2013).

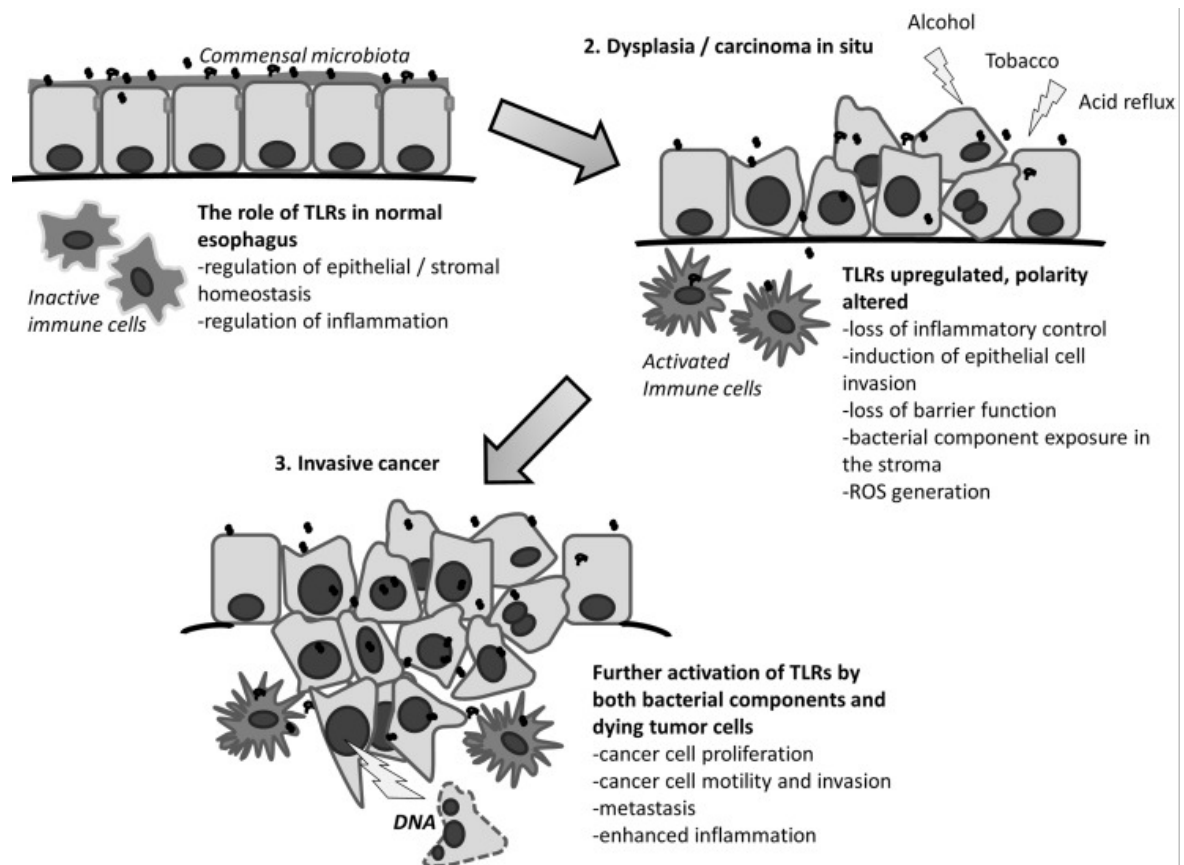


Figura 5 - O papel dos receptores Toll-like no câncer de esôfago.

(Kauppila *et al.* 2014)

Pacientes que apresentam câncer oral demonstram uma desregulação na resposta imune anti-tumoral. Um estudo realizado por Paleja *et al.* demonstrou que a estimulação dos receptores TLR por vários ligantes, como CpG-ODN (dinucleotídeo citosina-fosfato-guanosina não metilado) e LPS entre outros, não aumentaram significativamente a resposta citotóxica do tumor (Paleja *et al.*, 2013).

Visto que a biotecnologia é uma área em ascensão e muitos compostos biotecnológicos têm sido descobertos recentemente para a terapia de diversas patologias (Melo *et al.*, 2012), e o câncer é uma doença que causa muitas mortes ao redor do mundo, muitos esforços têm sido feitos para entender os mecanismos dos diversos subtipos de neoplasias existentes e desta forma descobrir novas opções de terapia.

Alguns resultados têm sido publicados a respeito da atividade anti-tumoral do LPS em determinados tipos de câncer. Entretanto, não foram encontrados relatos sobre os efeitos destas moléculas sobre o câncer de esôfago e de boca.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos dos compostos LPS e PgLPS em linhagens celulares humanas de tumor de esôfago e boca, respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a ação dos compostos LPS e PgLPS na viabilidade e proliferação das linhagens celulares de câncer de esôfago humano, OE19 e OE21, e na linhagem de carcinoma oral humano, HN30.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a ação do LPS e PgLPS na viabilidade das linhagens de câncer de esôfago humano OE19 e OE21 e de câncer de boca humano HN30.

b) Avaliar o efeito proliferativo do LPS e PgLPS nas células de câncer de esôfago e de boca.

c) Avaliar a expressão dos receptores TLR4 nas linhagens de câncer de esôfago humano OE19 e OE21 e de câncer de boca humano HN30.

d) Avaliar a ação do LPS sobre a ativação das células dendríticas na linhagem celular HN30.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

**“EFFECT OF LPS ON THE VIABILITY AND PROLIFERATION OF HUMAN
ORAL AND ESOPHAGEAL CANCER CELL LINES”**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Brazilian Journal of Microbiology (F.I. B2 para a área da Biotecnologia da CAPES).

EFFECT OF LPS ON THE VIABILITY AND PROLIFERATION OF HUMAN ORAL AND ESOPHAGEAL CANCER CELL LINES

Márcia Gonçalves^I, Angélica Regina Cappellari^{II}, André Avelino dos Santos Junior^{II}, Fernanda Olicheski de Marchi^{III}, Fernanda Souza Macchi^{III}, Krist Helen Antunes^{IV}, Ana Paula Duarte de Souza^{IV}, Fernanda Bueno Morrone^{I,II,V}

^IMestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^{II}Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^{III}Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^{IV}Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, Instituto de Pesquisa Biomédicas, Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^VInstituto de Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Fernanda Bueno Morrone. Mailing address: Av. Ipiranga, 6681. Prédio 12C, Sala 110. Partenon - Porto Alegre, RS, Brasil - CEP: 90619-900. Phone number: 55 51 3320 3512. Fax number: 55 51 3320 3612. fernanda.morrone@pucrs.br

ABSTRACT

The esophagus and mouth tumors are very frequent malignancies worldwide. Lipopolysaccharides (LPS) are capable of regulating gene expression of pro-inflammatory cytokines by binding to toll-like receptor 4 (TLR4). Recent studies show that LPS can increase the migration ability of human esophageal cancer cell line HKESC-2 by increasing its adhesion properties. However, the effect of LPS has not been tested on viability of human esophageal and oral cancer cells. This study aimed to determine the action of LPS on the cell proliferation and viability in OE19 (adenocarcinoma) and OE21 (squamous carcinoma) cell lines, representative of human esophageal cancer, and HN30 cell line, representative of human oral carcinoma. LPS was used as treatment to OE19 and OE21 cells, and PgLPS (*Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide) to HN30 cells. Viability was assessed by MTT assay and proliferation by cell counting. TLR4 expression was evaluated by real-time PCR. LPS at higher concentrations decreased significantly cell viability in both cell lines, adenocarcinoma (OE19) and squamous esophageal carcinoma (OE21) at different times of treatment. In addition, both cell lines, OE19 and OE21, expressed TLR4 receptor. Taken together, our data demonstrated that LPS at high concentrations might contribute to tumor death, in agreement with previously data.

Key words: LPS, oral cancer, esophageal cancer, TLR4.

INTRODUCTION

Esophageal cancer is the eighth most common in the world, with more than 480,000 new cases annually, and is responsible for over 400,000 deaths, making it the sixth leading cause of cancer death (Tarapore *et al.*, 2013). Risk factors such as alcohol consumption, smoking, nutritional deficiencies, food, drinking hot liquids and occupational exposure are involved with the development of esophageal tumors (Mota *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2013). Steffen *et al.* (2015) demonstrated that abdominal obesity is an indisputable risk factor for esophageal adenocarcinoma (Steffen *et al.*, 2015). The prognosis is low, with a 15% survival rate at 5 years (Arantes *et al.*, 2012). The two main histological types of esophageal cancer are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, which differ according to their risk factors and demographic distributions (Ma *et al.*, 2012). Although adenocarcinoma was the most common subtype in white men in the United States since the early 90s, squamous cell carcinoma is still the most prevalent subtype in the world (Almodova *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2013). Esophageal squamous cell carcinoma carries a very poor prognosis because many cases go undetected until the disease is at an advanced stage (XU *et al.* 2014).

Mortality from cancer of the oral cavity is high, with recent estimate of 128,000 deaths per year worldwide (Toporcov *et al.*, 2012). Types of oral cancer include malignant tumors of the salivary gland, sarcoma of soft tissue and bone of the jaw, melanoma, malignant odontogenic tumors, lymphoreticular malignancies, metastases and tumors located in any part of the body (Waal, 2013). The standard treatments for these cases include surgery and radiation; chemotherapy can be used in advanced cases or as palliative treatment (Romanini *et al.*, 2012; Girardi *et al.*, 2013). Main causes of oral cancer are similar for esophageal cancer (Chen *et al.*, 2013).

Increasing appreciation of tumor heterogeneity and the tumor-host interaction has stimulated interest in developing novel therapies that target both tumor cells and tumor microenvironment (Xu *et al.*, 2014). Lipopolysaccharides (LPS) are characteristic compounds of the cell wall of gram-negative bacteria (Yang *et al.*, 2012). In response to systemic exposure of LPS, pro-inflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor (TNF), interleukin (IL)-1 β , and interferon- γ produced by the host mediate many inflammatory and hemodynamic changes and organ dysfunction in sepsis (Vernooy *et al.*, 2001). LPS are able to regulate gene expression of pro-inflammatory cytokines through activation of toll-like receptor 4 (TLR4) via NF- κ B (Yang *et al.*, 2012).

Recently, there has been a growing interest in anti-tumor functions initiated by the innate immune response. TLRs are type I transmembrane protein with extracellular domains comprised largely of leucine-rich repeats and intracellular signaling domains that play a crucial role in inflammation and host defense against invading microorganisms through the recognition of pathogen-associated molecular patterns such as LPS, lipopeptides, RNA, and bacterial DNA (Sun *et al.*, 2012). Their activated signaling pathways in cancer cells could have profound consequences for tumor growth by promoting cancer progression, anti-apoptotic activity, and resistance to host immune responses (Sun *et al.*, 2012). A study by Paleja *et al.* (2013) demonstrated that the stimulation of the TLR by various ligands such as LPS and CpG among others, do not significantly increased tumor cytotoxic response (Paleja *et al.*, 2013).

Of interest, stimulation of TLR4 with LPS could promote the migration and invasion of lung cancer cells (Liu *et al.*, 2015). TLR4 has been implicated in tumor cell invasion, survival, and metastasis in a variety of cancers (Yang *et al.*, 2014). Recent studies show that LPS can increase the migration ability of human cell esophageal cancer HKESC-2 by increasing its binding properties by signaling via TLR4 (Rousseau *et al.*, 2013). In this

way, the aim of this study was to determine the action of LPS and PgLPS in cancer cell lines proliferation and viability using human esophagus OE19 and OE21 and the human oral carcinoma HN30. Furthermore, we intend to evaluate the expression of TLR receptor 4 in human esophageal and human oral cancer cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

LPS and PgLPS were obtained by Invitrogen. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Sigma Aldrich and culture media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and RPMI (Roswell Park Memorial Institute), Trypsin and Fetal Bovine Serum (FBS) were obtained from Life Technologies (Gibco).

Cell Culture and Treatments

The cell lines OE19 (adenocarcinoma) and OE21 (squamous cell carcinoma) and HN30 (oral carcinoma) were obtained through donation of National Cancer Institute (INCA, RJ). They were kept in an incubator at 37°C with 5% CO₂ and 95% humidity. The OE19 and OE21 cell lines were maintained in culture with RPMI 1640 and HN30 with DMEM, both medium supplemented with 10% FBS, fungizone and antibiotic. The OE19 cell line corresponds to adenocarcinoma of the esophagus, gastroesophageal junction, pathological stage III with moderate differentiation. The OE21 cell line corresponds to squamous cell carcinoma of the middle third of the esophagus, pathological stage IIA, with moderate differentiation. When the cells reached 70-80% confluence were treated for 24, 48 and 72 hours at concentrations of 0.1, 1, 10, 20, 50 and 100 µg/ml of LPS (for OE19 and OE21 cell lines) and at concentrations of 0.1, 1, 10, 20, 50 and 100 µg/ml for PgLPS (only for HN30 cell line).

Cell Viability – MTT Assay

After treatment, the cell viability was evaluated by MTT (tetrazolium blue thiazol - 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] - 2,5-diphenyl-tetrazolium) assay. Cells were plated in 96 well plates with cell density of 5×10^3 cells per well and treated after reach confluence. Cell cycle was synchronized by reduction of the culture medium to 5% and 0.5% FBS. The respective culture medium plus 10% FBS was used as positive control. After 24, 48 and 72h of treatment, the experiment of MTT was performed. One hundred (100) μ l of a solution containing 90% medium and 10% of 5 mg MTT / ml diluted in PBS (Phosphate Buffered Saline) were added. The cells were then incubated for 3 hours at 37°C. Follow, MTT solution was discarded and the plate was completely dried, were added 100 μ l of DMSO in each well. The quantification was done by absorbance spectrophotometer Spectra MaxM2e Soft Max ® from Molecular Devices Pro 5 to 492 nm.

Cell Proliferation – Cell Count

The cell number was evaluated after treatment using a counter (Countess II FL - Life Technologies in). It was held plating of 2×10^4 cells per well in 24-well plates. Cell cycle was synchronized by reduction of the culture medium to 5% following by 0.5% FBS. The respective culture medium plus 10% FBS was used as positive control. The respective culture medium plus 10% FBS was used as positive control. The experiments were performed after 24, 48 and 72 hours of treatment. The culture medium was discarded and added 100 μ L Trypsin / EDTA solution (Disodium ethylenediamine tetraacetic acid). Trypan Blue stain was used for counting to exclude non-viable cells. The number of viable cells was determined by perceptual in relation to control.

qRT-PCR Expression

RNA from treated cells was extracted using RNAeasy kit (Qiagen, EUA). cDNA was obtained using Sensiscript Reverse Transcription kit (Qiagen). Relative Real Time PCR was carried out on the equipment StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems), with StepOne Software 2.3 program, using primers 20x TaqMan® Experimental Gene Assay, for the targets TLR4 Hs01060206_m1 and β -actin ACTB (20x) 4333762F (Applied Biosystems) as constitutive gene for reaction control. To determine the relative RNA expression levels was used $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

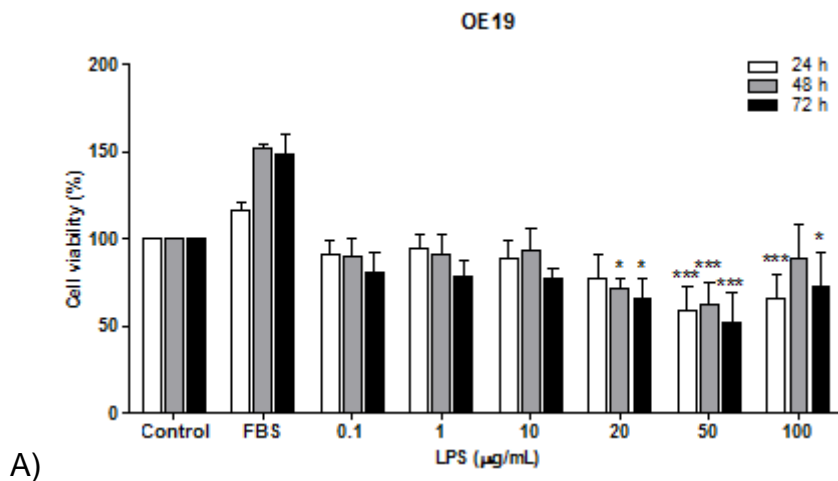
Statistical Analysis

The statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-hoc test. Results were presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and p values smaller than 0.05 were considered significant ($p < 0.05$).

RESULTS

LPS is the principal component of Gram negative bacteria that activates the innate immune system. PgLPS is a purified preparation of lipopolysaccharide from the Gram-negative bacteria *Porphyromonas gingivalis*. Since PgLPS is an important virulence factor in the mechanisms of periodontal disease we chose to test this compound in oral carcinoma (HN30 cell line).

Firstly, we evaluated LPS effect on esophageal cancer cells viability. The results of the MTT assay shown in Figure 1A demonstrated that LPS, at the higher concentrations of 20, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$, decreased significantly OE19 cell viability when compared to control, for all the times tested (24, 48 and 72h). The effect of LPS on OE21 cells was similar to OE19 cells (Figure 1B). In contrast, PgLPS treatment in HN30 cells increased the cell viability in relation to control after 48h (Figure 1C), but these results were not significant.



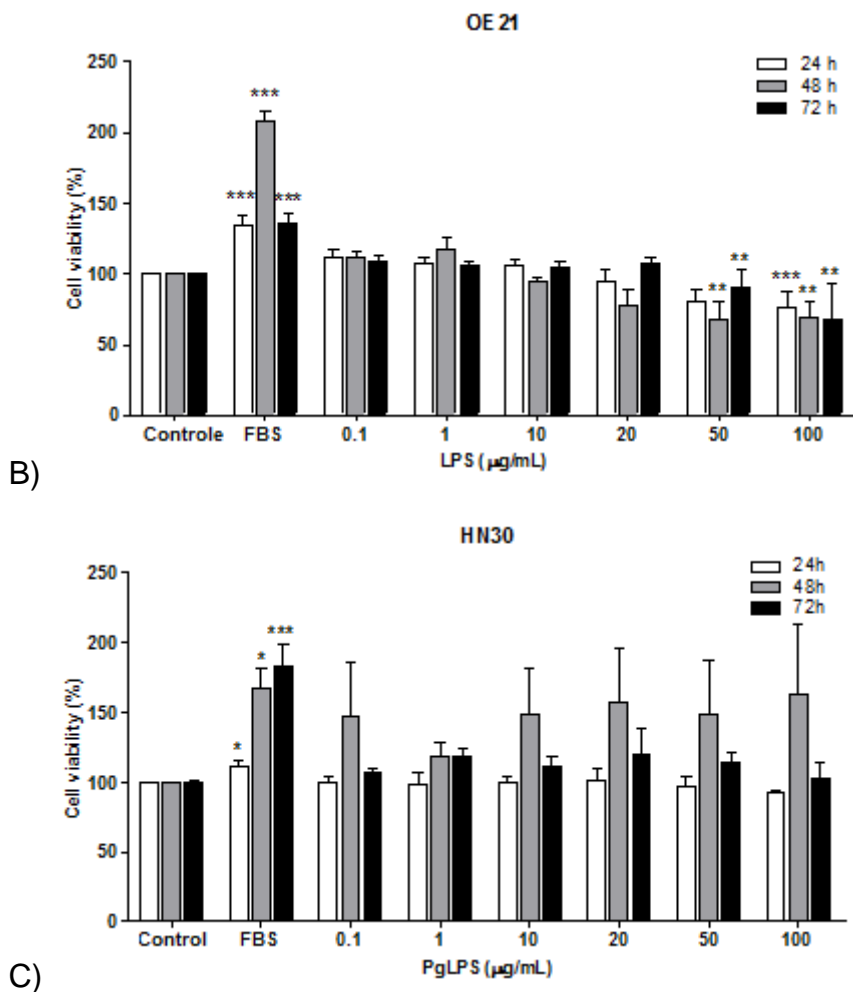


Figure 1. Evaluation of cell viability of OE19 (A), OE21 (B) and HN30 (C) cell lines after 24, 48 and 72 hours of treatment with LPS and PgLPS respectively. The experiments were performed five times in triplicate. Each column represents the mean \pm SEM. * $P < 0.01$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ for comparison versus control, as determined by ANOVA following by Tukey post-hoc test.

In addition, in order to evaluate the proliferative effect of LPS, we count the cells after treatment. The results shown in Figure 2A, demonstrated that LPS at the higher concentrations (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) decreased significantly OE19 cell number when compared to control, in 48 and 72 hours after treatment. The effect of LPS on squamous esophageal carcinoma cells (OE21 cell line) was quite similar to esophageal adenocarcinoma cells (OE19), presented in Figure 2B. It was observed a significant decrease in cell number when compared to control at higher concentrations of LPS (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). The results with oral cancer, HN30 cell line, showed that PgLPS

treatment had no effect on cell number, although there was a tendency to increase the cell viability at 48 h treatment (Figure 2C). Overall, our results demonstrated that LPS present a distinct effect on cell proliferation and viability depending on the concentration used.

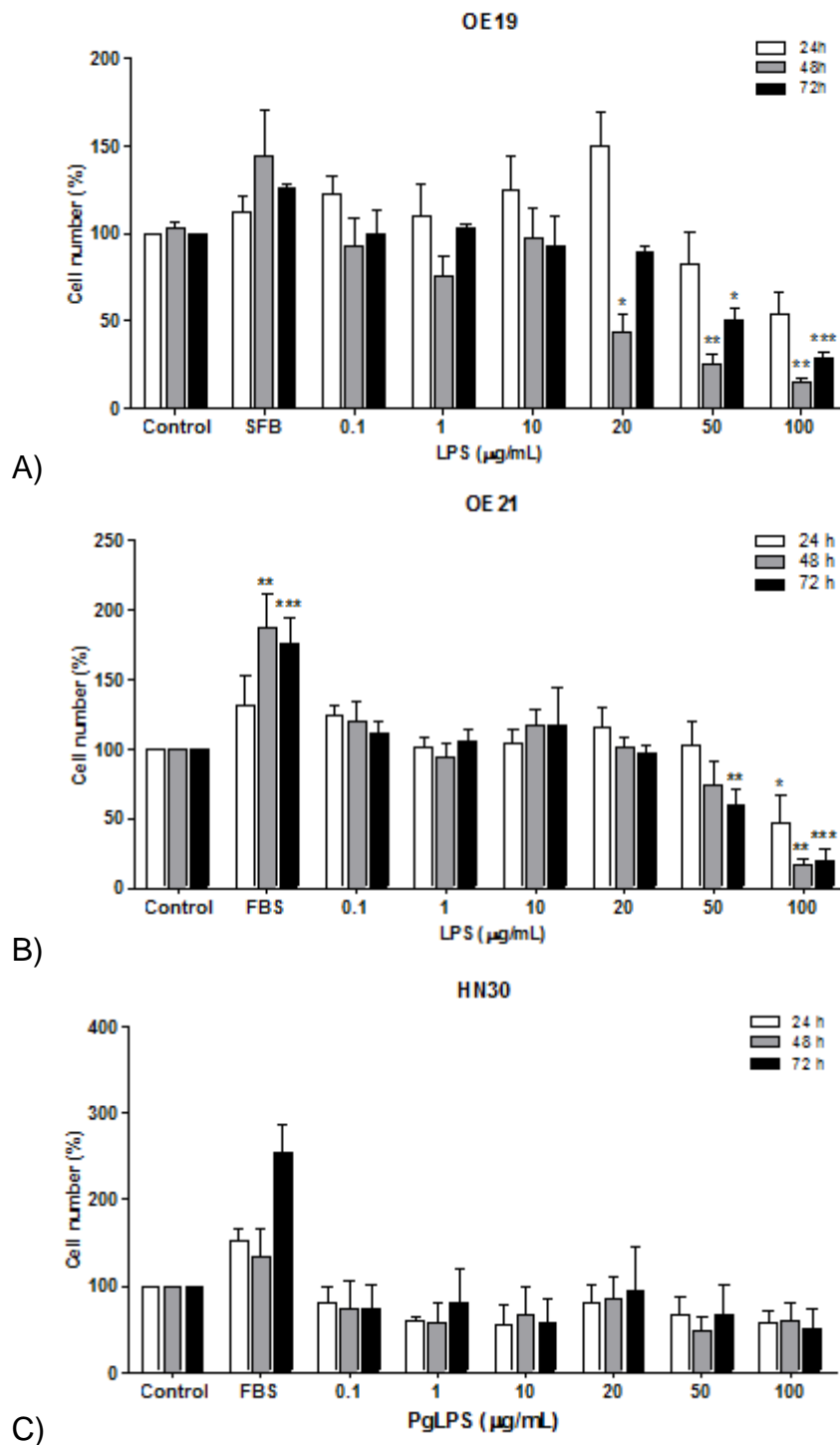


Figure 2. Cell proliferation of OE19 (A), OE21 (B) and HN30 (C) cell lines after 24, 48 and 72 hours of treatment with LPS and PgLPS by cell count assay. The experiments were carried out at least five times in triplicate. Each column represents the mean \pm SEM. * $P < 0.01$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ for comparison versus control, as determined by ANOVA following by Tukey post-hoc test.

In order to understand the mechanisms involved in LPS compounds effects, we investigated the expression of TLR4 in the OE19 and OE21 cell lines, since the results were significant for just these cell lines in the MTT and cell count assays. The results of qRT-PCR assay showed that esophageal cancer OE19 and OE21 cell lines expressed toll-like receptor TLR4 (Figures 3A and 3B). Squamous esophageal carcinoma cell line (OE21) showed a higher expression of this receptor when compared to adenocarcinoma cells (OE19).

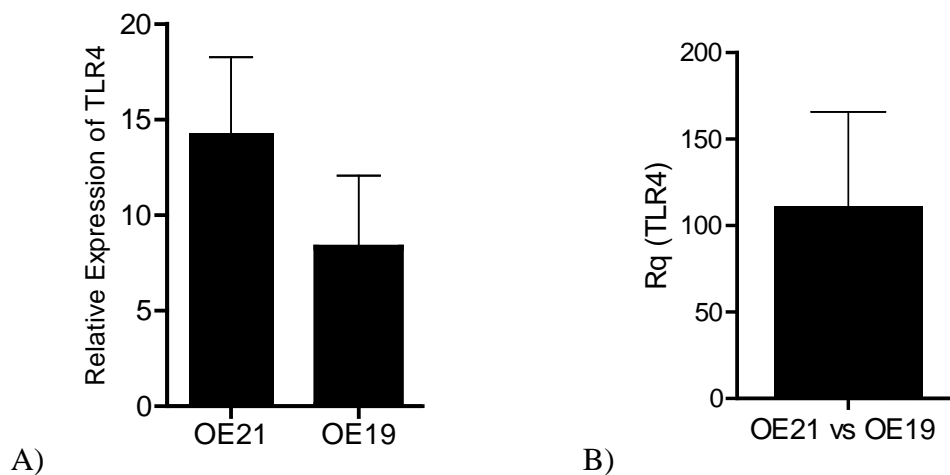


Figure 3. Relative expression of TLR4 in cell lines OE21 and OE19 by qRT-PCR: (A) each cell line OE21 and OE19 relative expression and (B) relative expression of OE21 vs OE19.

DISCUSSION

In this study, we used different cell lines of esophageal carcinoma (OE19 and OE21) and oral cell carcinoma (HN30) to test LPS effect on cell proliferation and survival. OE19 cell line corresponds to adenocarcinoma of the esophagus, gastroesophageal junction, pathological stage III, with moderate differentiation. On the other hand, OE21 cell line corresponds to squamous cell carcinoma of the middle third of the esophagus, pathological stage IIA, with moderate differentiation. Given the different characteristics of the cell lines evaluated, our data demonstrated that LPS treatment decreased significantly cell viability and cell number in the esophageal adenocarcinoma cells (OE19 cell line) in all times of treatment (24, 48 and 72 hours). In a similar way, treatment with LPS promoted a decrease in cell viability on squamous esophageal carcinoma cells (OE21 cell line) at 24, 48 and 72 hours after treatment. This may indicate that cancer cells can be sensitized to bacteria and host-derived ligands, like LPS. In addition, here we demonstrated that both cells (OE21 and OE19) expressed TLR4 and this receptor is up regulated in both squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus.

Previous study has shown that LPS increases migration and adhesive properties of esophageal squamous carcinoma cells (HKESC-2 and HKESC-1) by TLR4 stimulation via p38 and selectin, contributing to tumor metastasis (Rousseau *et al.*, 2013). In fact, Rousseau *et al.* tested a low LPS concentration of 0,1ug/mL, and on this same concentration, we found that LPS increased tumor cells number. However, when we used higher concentrations of LPS we found a decrease in tumor cells number. One reason for this different effect might be due to TNF production; at high concentration, LPS could be inducing the production of a great amount of TNF, consequently being toxic to the cell, leading to cell death.

Yang et al. (2014) showed that activation of TLR4 might be related to tumor growth because it regulates the expression of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer cells. The stimulation of TLR4 by LPS promoted tumor genesis and the development of metastatic lesions in the liver of mice (Yang *et al.*, 2014).

There seems to be a connection between TLRs and esophageal cancer development. In fact, poor prognosis in strongly TLR-expressing tumors could be an indicator of increased level of tumor–stroma interaction (Kauppila, 2014). Barrett’s esophagus (BART cell line) were stimulated with the TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS). It was shown that stimulation of TLR4 with LPS resulted in NF- κ B activation and an increase of IL-8 secretion (Verbeek *et a.*, 2014). In our study, we observed that the PgLPS at high concentration has a tendency to increase cell viability in oral cancer cells (HN30). In fact, the structure of the LPS of *Porphyromonas gingivalis* (PgLPS) has a further particular antigenic moiety and is recognized by TLR2, which is responsible for the recognition of cell wall components of gram positive bacteria (Sipert *et al.*, 2013).

Genetic studies have been performed on TLR polymorphisms in esophageal cancer. Unlike in gastric cancer, polymorphisms in *TLR4 + 896A > G* and *TLR9-1237T/C* genes were not associated to esophageal cancer risk (Kauppila, 2014). However, genetic up-regulation of CD14, a co-receptor of TLR4, was observed in families with history of esophageal cancer (Kauppila, 2014). This wound reaction could facilitate the passage of bacteria through epithelium and result in the loss of host-microbiome homeostasis, further leading to abnormal activation of for example TLR2, 4, 5, and 9 by bacterial components. Inflammation and wound reaction then could produce a vicious cycle of cellular damage, which might be a major player in esophageal metaplasia and carcinogenesis (Kauppila, 2014).

Taken together, our data demonstrated that LPS at high concentrations might contribute to tumor death, in agreement with previously data. Further studies will be carried out in order to verify the signaling pathway and receptors involved in the decrease of cell viability observed in human oral carcinoma after PgLPS treatment. In addition, TLR4 could be a future target to studies on human esophageal and oral tumors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Luis Felipe Ribeiro and Dr Maria Martha Campos for the donation of the cell lines, and the FINEP research grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRSINFRA) # 01.11.0014-00.

REFERENCES

ALMODOVA, Emiliano de Carvalho *et al.* Atrophic gastritis: Risk factor for esophageal squamous cell carcinoma in a Latin-American population. **World Journal of Gastroenterology**, Barretos, v. 19, n. 13, p. 2060-2064, 2013.

ARANTES, Vitor. Advances in the management of early esophageal carcinoma. **Rev. Col. Bras. Ci**, Japan, v. 39, n. 6, p. 534-543, 2012.

CHEN, Jun-Jie *et al.* TRAIL induces apoptosis in oral squamous carcinoma cells – a crosstalk with oncogenic Ras regulated cell surface expression of death receptor 5. **Oncotarget**, Bethesda, v. 4, n. 2, p. 206-217, Feb. 2013.

GALLOIS, A.; BHARDWAJ, N. Dendritic cell-targeted approaches to modulate immune dysfunction in the tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, EUA, v 4, n. 436, Dez. 2013.

GIRARDI, Fábio Muradás *et al.* Correlation between clinical and pathological data and surgical margins in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Brazilian Journal of otorhinolaryngology**, Porto Alegre, v. 79, n. 2, p. 190-195, 2013.

GÜL, Nuray *et al.* Macrophages mediate colon carcinoma cell adhesion in the rat liver after exposure to lipopolysaccharide. **OncolImmunology**, Amsterdam, v. 1, n. 9, p. 1517-1526, dez. 2012.

KAUPPILA, Joonas H.; SELANDER, Katri S. Toll-Like Receptors in Esophageal Cancer. **Front Immunol**, Finlândia, v. 5, n. 200, Mai. 2014.

LIU, Xiyu *et al.* NADPH oxidase 1-dependent ROS is crucial for TLR4 signaling to promote tumor metastasis of non-small cell lung cancer. **Tumor Biol.**, China, Jan. 2015.

MA Zheng *et al.* Transcriptome Network Analysis Reveals Potential Candidate Genes for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, China, v. 13, p. 763-773, 2012.

MOTA, Orlando Milhomem *et al.* Risk factors for esophageal cancer in a low-incidence area of Brazil. **São Paulo Med. J.**, Goiânia, v. 131, n.1, p. 27-34, 2013.

PALEJA, B. *et al.* Decreased functional response to Toll like receptor ligands in patients with oral cancer. **Hum Immunol**, Índia, v. 74, n. 8, p. 927-936, ago. 2013.

REN, P. *et al.* Clinical significance of phospholipase A2 group IIA (PLA2G2A) expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, China, v. 17, p. 752-757, 2013.

REN, Peng *et al.* Elevated serum levels of human relaxin-2 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, China, v. 19, n. 15, p. 2412-2418, abr. 2013.

ROMANINI, Juliana *et al.* The role of CXCR2 chemokine receptors in the oral squamous cell carcinoma. **Invest New Drugs**, Porto Alegre, v. 30, p. 1371-1378, 2012.

ROUSSEAU, MC *et al.* Lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 signaling enhances the migratory ability of human esophageal cancer cells in a selectin-dependent manner. **Surgery**, Canadá, v. 154, n. 1, p. 69-77, jul. 2013.

SIPERT, Carla Renata *et al.* CCL3 and CXCL12 production in vitro by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by Porphyromonas gingivalis LPS. **J Appl Oral Sci**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 99-105, 2013.

SOUZA, A. P.; BONORINO, C. The immune system: endogenous anticancer mechanism. **Frontier in Immunology**, Porto Alegre, v. 4, p. 2354-2364, Jun 2012.

STEFFEN, A. *et al.* General and abdominal obesity and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **Int J Cancer**, Alemanha, Jan, 2015.

SUN, Zujun *et al.* Role of toll-like receptor 4 on the immune escape of human oral squamous cell carcinoma and resistance of cisplatin-induced apoptosis. **Molecular Cancer**, China, v. 11, n. 33, 2012.

TARAPORE, Rohinton S.; YANG, Yizeng; KATZ, Jonathan P. Restoring KLF5 in Esophageal Squamous Cell Cancer Activates the JNK Pathway Leading to Apoptosis and Reduced Cell Survival. **Neoplasia**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 472-480, May. 2013.

THAKUR, Binary; LI, Hui; DEVKOTA, Mukti. Results of management of esophageal and GE junction malignancies in Nepalese contexto. **Journal of Thoracic Disease**, China, v. 5, n. 2, p. 123-128, Jan. 2013.

TOPORCOV, Tatiana N. *et al.* Consumo de alimentos de origem animal e câncer de boca e orofaringe. **Rev Panam Salud Publica**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 185-191, mar. 2012.

VERBEEK R.E. *et al.* Toll-like receptor 4 activation in Barrett's esophagus results in a strong increase in COX-2 expression. **J Gastroenterol**, v. 49, p. 1121-1134, 2014.

VERNOOY, J H. J. *et al.* Intratracheal Instillation of Lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, Holanda, v. 24, p. 569-576, 2001.

WAAL, Isaïc van der. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; Some considerations. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 33-37, Jan. 2013.

WANG, Juping *et al.* Cancer-derived immunoglobulin G promotes LPS-induced proinflammatory cytokine production via binding to TLR4 in cervical cancer cells. **Oncotarget**, China, v. 5, n. 20, p. 9727-9743, Out. 2014.

XU, Wen. Wen. *et al.* Targeting VEGFR1- and VEGFR2-expressing non-tumor cells is essential for esophageal cancer therapy. **Oncotarget**, China, Dez. 2014.

YANG, Huan *et al.* Toll-Like Receptor 4 Prompts Human Breast Cancer Cells Invasiveness via Lipopolysaccharide Stimulation and Is Overexpressed in Patients with Lymph Node Metastasis. **Plos One**, USA, v. 9, n. 10, Out. 2014.

YANG, Liying; FRANCOIS, Fritz; PEI, Zhiheng. Molecular pathways: pathogenesis and clinical implications of microbiome alteration in esophagitis and Barret esophagus. **Clinical Cancer Research**, Nova Iorque, v. 18, n. 8, p. 21

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi realizado o tratamento com LPS em diferentes concentrações (0,1, 1, 10, 20, 50 e 100 µg/mL) para as linhagens celulares de carcinoma de esôfago OE21 e OE19 nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas. Também foi testado o PgLPS nas mesmas concentrações e tempos de tratamento para a linhagem celular de câncer de boca HN30.

A linhagem celular OE19 corresponde a adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica, estágio patológico III com diferenciação moderada. A linhagem OE21 corresponde a carcinoma epidermóide do terço médio do esôfago, estágio patológico IIA, com diferenciação moderada. A linhagem HN30 corresponde a carcinoma de boca.

Tendo em vista as diferentes características das linhagens celulares avaliadas, os resultados demonstraram que o LPS diminuiu significativamente a viabilidade celular e o número de células nas células do adenocarcinoma do esôfago (linhagem celular OE19) em todos os tempos de tratamento (24, 48 e 72 horas). De um modo semelhante, o tratamento com LPS promoveu uma diminuição da viabilidade celular em células do carcinoma de células escamosas (linhagem celular OE21) em 24, 48 e 72 horas após o tratamento. Isso pode indicar que as células do câncer de esôfago podem ser sensibilizados pelas bactérias e os ligantes derivados do hospedeiro, como LPS. Além disso, aqui nós demonstramos que ambas as linhagens celulares (OE21 e OE19) expressaram o TLR4 e este receptor pode estar envolvido no carcinoma de células escamosas e no adenocarcinoma do esôfago. Além disso, os resultados do ensaio de qRT-PCR mostraram que estas linhagens celulares expressam os receptores *toll-like* TLR4.

De acordo com resultados obtidos por Yang *et al.* (2014) a ativação do TLR4 pode estar relacionada com o crescimento tumoral, pois regula a expressão de RNAm do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células humanas de câncer de mama. A estimulação do TLR4 com LPS promove o desenvolvimento de lesões metastáticas no fígado de camundongos (Yang *et al.*, 2014). Estudo anterior demonstrou que o LPS aumenta as propriedades adesivas e de migração de células de carcinoma escamoso esofágico (HKESC-2 e HKESC-1) por estimulação de TLR4 através de p38 e

selectina, contribuindo para o surgimento de metástases (Rousseau *et al.*, 2013). Na verdade, Rousseau *et al.* testaram uma baixa concentração de LPS de 0,1ug/mL, e nesta mesma concentração, verificou-se que o LPS aumentou o número de células tumorais. No entanto, quando usado em maiores concentrações, encontramos uma diminuição no número de células tumorais. Uma razão para este efeito diferente pode ser devido à produção de TNF; em concentração elevada, o LPS pode induzir a produção de uma grande quantidade de TNF, e conseqüentemente, ser tóxico para a célula, levando à morte celular.

De modo interessante, observou-se que o tratamento com PgLPS aumentou a viabilidade celular no carcinoma de boca (linhagem celular HN30), após 48 e 72 horas de tratamento. De fato, a estrutura do LPS de *Porphyromonas gingivalis* (PgLPS) tem uma porção antigênica ainda mais específica e é reconhecido por TLR2, que é responsável pelo reconhecimento de componentes da parede celular de bactérias gram-positivas (Sipert *et al.*, 2013). Alguns autores mencionam que a exposição a LPS pode ter efeitos opostos sobre a adesão de células tumorais e no desenvolvimento de tumores (Gul *et al.*, 2012). Nossos resultados utilizando a linhagem celular de carcinoma de boca, HN30, vão ao encontro dos resultados encontrados nestes estudos mencionados.

Diversos estudos têm demonstrado que o tumor pode suprimir a resposta imune (Souza, 2012), especialmente por regulação de moléculas tais como CD86 na superfície de células dendríticas (Gallois, 2013). O LPS induz citocinas, as quais poderiam modular a ativação de células dendríticas. Neste estudo, testou-se a hipótese de que o tratamento com LPS em células tumorais poderia estimular a produção de citocinas ou de outros mediadores pró-inflamatórios que ativam as células dendríticas.

Yang *et al.* (2014) mostraram que a ativação de TLR4 pode estar relacionada com o crescimento do tumor porque ela regula a expressão de mRNA para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células do câncer de mama. A estimulação por LPS de TLR4 promoveu crescimento tumoral e o desenvolvimento de lesões metastáticas no fígado de ratos (Yang *et al.*, 2014).

Avaliando todos os resultados obtidos, nossos dados demonstram que os compostos de LPS têm efeitos opostos sobre a viabilidade celular, dependendo da linhagem celular testada. Estudos posteriores são necessários para avaliar as vias de sinalização celular e o mecanismo envolvido na diminuição da viabilidade do carcinoma de células escamosas de esôfago e do adenocarcinoma de esôfago, causada pelo LPS através da estimulação do TLR4. Também é recomendável que novos estudos sejam realizados, para verificar o receptor e a via de sinalização envolvidos no aumento da viabilidade celular observada nas células de carcinoma oral humano após o tratamento com PgLPS.

Parece haver uma conexão entre TLRs e desenvolvimento do câncer de esôfago. Na verdade, o mau prognóstico está relacionado com tumores que expressam TLR (Kauppila, 2014). Esôfago de Barrett foram estimulados com o lipopolissacarídeo agonista TLR4 (LPS). Foi demonstrado que a estimulação de TLR4 com LPS resultou na ativação de NF- κ B e em um aumento da secreção de IL-8 (Verbeek *et al.*, 2014). Em nosso estudo, observamos que o PgLPS em alta concentração tem uma tendência para aumentar a viabilidade celular em células de câncer oral (HN30). Na verdade, a estrutura do LPS de *Porphyromonas gingivalis* (PgLPS) tem uma porção antigênica ainda mais particular e é reconhecido por TLR2, que é responsável pelo reconhecimento de componentes da parede celular de bactérias gram-positivas (Sipert *et al.*, 2013).

Ao contrário do câncer gástrico, polimorfismos em TLR4 + 896A> genes G e TLR9-1237T / C não foram associados ao risco de câncer de esôfago (Kauppila, 2014). No entanto, a regulação de CD14, um co-receptor de TLR4, foi observada em famílias com história de câncer de esôfago (Kauppila, 2014). Esta reação poderia facilitar a passagem de bactérias através do epitélio e resultar na perda de homeostase microrganismo-hospedeiro, o que leva ainda a ativação anormal de, por exemplo, TLR2, 4, 5 e 9 pelos componentes bacterianos. A inflamação poderia produzir um ciclo vicioso de dano celular, o que pode ser uma importante peça no câncer de esôfago (Kauppila, 2014).

Avaliados em conjunto, nossos dados demonstram que o LPS em concentrações elevadas pode contribuir para a morte do tumor, de acordo com dados prévios. Estudos adicionais serão realizados de modo a verificar a via de sinalização e os receptores envolvidos na diminuição da viabilidade celular

observada no carcinoma oral humano após tratamento com PgLPS. Além disso, o TLR4 poderia ser um alvo para estudos futuros de câncer de esôfago e boca.

5 PERSPECTIVAS

A fim de darmos continuidade aos resultados que foram obtidos e apresentados neste trabalho, almejamos avaliar os seguintes parâmetros:

- Utilização do composto CpG-ODN, como forma de tratamento para avaliar proliferação e viabilidade das linhagens tumorais de células de esôfago e boca através do ensaio MTT.

- Avaliação do tipo de morte celular causada pelo CpG-ODN, LPS e PgLPS nas linhagens OE19, OE21 e HN30, utilizando citometria de fluxo.

- Avaliação da expressão dos receptores TLR 9 e 2 nas linhagens de câncer de esôfago humano OE19 e OE21 e de câncer de boca humano HN30.

- Investigação das vias de sinalização intracelular envolvidas por citometria de fluxo, nas linhagens de câncer de esôfago e de boca estimuladas pelos compostos CpG-ODN, LPS e PgLPS.

REFERÊNCIAS

ALMODOVA, Emiliano de Carvalho *et al.* Atrophic gastritis: Risk factor for esophageal squamous cell carcinoma in a Latin-American population. **World Journal of Gastroenterology**, Barretos, v. 19, n. 13, p. 2060-2064, 2013.

ARANTES, Vitor. Advances in the management of early esophageal carcinoma. **Rev. Col. Bras. Ci**, Japan, v. 39, n. 6, p. 534-543, 2012.

BIANCHI, Carlos. Grupos de pesquisa em biotecnologia moderna no Brasil: uma revisão sobre os fundamentos da política de CTI. **Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad** – CTS, Argentina, v. 07, n. 21, p. 23-43, Ago. 2012.

CHEN, Jun-Jie *et al.* TRAIL induces apoptosis in oral squamous carcinoma cells – a crosstalk with oncogenic Ras regulated cell surface expression of death receptor 5. **Oncotarget**, Bethesda, v. 4, n. 2, p. 206-217, Feb. 2013.

DESHPANDE, Anshula; TANDON; DESHPANDE, Neeraj. Low resource screening method of pre-cancerous lesions and its reversal by *Triphala* in teenage Indian population. **Ayu**, India, v. 35, n. 2, p. 160-167, Jun. 2014.

GALLOIS, A.; BHARDWAJ, N. Dendritic cell-targeted approaches to modulate immune dysfunction in the tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, EUA, v 4, n. 436, Dez. 2013.

GIRARDI, Fábio Muradás *et al.* Correlation between clinical and pathological data and surgical margins in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Brazilian Journal of otorhinolaryngology**, Porto Alegre, v. 79, n. 2, p. 190-195, 2013.

GÜL, Nuray *et al.* Macrophages mediate colon carcinoma cell adhesion in the rat liver after exposure to lipopolysaccharide. **Oncolimmunology**, Amsterdam, v. 1, n. 9, p. 1517-1526, dez. 2012.

HASSONA, Y. *et al.* Mouth cancer awareness and beliefs among dental patients. **Int Dent J**. Jordânia, Nov. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA/MS). **Estimativas 2014**, Disponível: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR> (capturado em 25 de janeiro de 2015). INCA 2014.

JANSEN, L. *et al.* Recent cancer survival in Germany: An analysis of common and less common cancers. **Int J Cancer**, Alemanha, v. 10, Nov. 2014.

KAUPPILA, Joonas H.; SELANDER, Katri S. Toll-Like Receptors in Esophageal Cancer. **Front Immunol**, Finlândia, v. 5, n. 200, Mai. 2014.

LIU, Xiyu *et al.* NADPH oxidase 1-dependent ROS is crucial for TLR4 signaling to promote tumor metastasis of non-small cell lung cancer. **Tumor Biol.**, China, Jan. 2015.

MA Zheng *et al.* Transcriptome Network Analysis Reveals Potential Candidate Genes for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, China, v. 13, p. 763-773, 2012.

MELO, Cristiane da Silva *et al.* Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p. 469-477, 2012.

MERCHANT, Nipun B. *et al.* Evidence for Enhanced Telomerase Activity in Barrett's Esophagus with Dysplasia and Adenocarcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Tennessee, v. 14, n. 2, p. 679-683, 2013.

MOTA, Orlando Milhomem *et al.* Risk factors for esophageal cancer in a low-incidence area of Brazil. **São Paulo Med. J.**, Goiânia, v. 131, n.1, p. 27-34, 2013.

NATIONAL CANCER INSTITUTE, **Estimated new cases and deaths: 2014**. Disponível: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/esophageal> (capturado em 25 de janeiro de 2015). NCI 2014.

NEMOTO, Renato Paladino *et al.* Oral cancer preventive campaigns: are we reaching the real target? **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, Brasil, v. 14, n. 127, Mar. 2014.

NIU, Xiaofeng *et al.* Protective effects of Isofraxidin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**, China, v. 24, n. 2, p. 432-439, Jan. 2015.

PALEJA, B. *et al.* Decreased functional response to Toll like receptor ligands in patients with oral cancer. **Hum Immunol**, Índia, v. 74, n. 8, p. 927-936, ago. 2013.

REN, P. *et al.* Clinical significance of phospholipase A2 group IIA (PLA2G2A) expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, China, v. 17, p. 752-757, 2013.

REN, Peng *et al.* Elevated serum levels of human relaxin-2 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, China, v. 19, n. 15, p. 2412-2418, abr. 2013.

ROMANINI, Juliana *et al.* The role of CXCR2 chemokine receptors in the oral squamous cell carcinoma. **Invest New Drugs**, Porto Alegre, v. 30, p. 1371-1378, 2012.

ROUSSEAU, MC *et al.* Lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 signaling enhances the migratory ability of human esophageal cancer cells in a selectin-dependent manner. **Surgery**, Canadá, v. 154, n. 1, p. 69-77, jul. 2013.

SIPERT, Carla Renata *et al.* CCL3 and CXCL12 production in vitro by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by *Porphyromonas gingivalis* LPS. **J Appl Oral Sci**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 99-105, 2013.

SOUZA, A. P.; BONORINO, C. The immune system: endogenous anticancer mechanism. **Frontier in Immunology**, Porto Alegre, v. 4, p. 2354-2364, Jun 2012.

STEFFEN, A. *et al.* General and abdominal obesity and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **Int J Cancer**, Alemanha, Jan, 2015.

SUN, Zujun *et al.* Role of toll-like receptor 4 on the immune escape of human oral squamous cell carcinoma and resistance of cisplatin-induced apoptosis. **Molecular Cancer**, China, v. 11, n. 33, 2012.

TARAPORE, Rohinton S.; YANG, Yizeng; KATZ, Jonathan P. Restoring KLF5 in Esophageal Squamous Cell Cancer Activates the JNK Pathway Leading to Apoptosis and Reduced Cell Survival. **Neoplasia**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 472-480, May. 2013.

THAKUR, Binary; LI, Hui; DEVKOTA, Mukti. Results of management of esophageal and GE junction malignancies in Nepalese contexto. **Journal of Thoracic Disease**, China, v. 5, n. 2, p. 123-128, Jan. 2013.

TOPORCOV, Tatiana N. *et al.* Consumo de alimentos de origem animal e câncer de boca e orofaringe. **Rev Panam Salud Publica**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 185-191, mar. 2012.

VERBEEK R.E. *et al.* Toll-like receptor 4 activation in Barrett's esophagus results in a strong increase in COX-2 expression. **J Gastroenterol**, v. 49, p. 1121-1134, 2014.

VERNOOY, Juanita H. J. *et al.* Intratracheal Instillation of Lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, Holanda, v. 24, p. 569-576, 2001.

VOGL, Thomas; HARTNER, Franz S.; GLIEDER, Anton. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, Austria, v. 24, p. 1-8, 2013.

WAAL, Isaïc van der. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; Some considerations. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 33-37, Jan. 2013.

WANG, Juping *et al.* Cancer-derived immunoglobulin G promotes LPS-induced proinflammatory cytokine production via binding to TLR4 in cervical cancer cells. **Oncotarget**, China, v. 5, n. 20, p. 9727-9743, Out. 2014.

WHO, **Global data on incidence of Oesophageal cancer: WHO report 2012.**
XU, Chang *et al.* Integrative Genomics in Combination with RNA Interference Identifies Prognostic and Functionally Relevant Gene Targets for Oral Squamous Cell Carcinoma. **Potential Therapeutic Targets for Oral Carcinoma**, USA, v. 9, n. 1, p. 1-13, Jan. 2013.

XU, Wen. Wen. *et al.* Targeting VEGFR1- and VEGFR2-expressing non-tumor cells is essential for esophageal cancer therapy. **Oncotarget**, China, Dez. 2014.

YAN, Xisheng; JIANG, Enshe; WENG, Han-Rong. Activation of toll like receptor 4 attenuates GABA synthesis and postsynaptic GABA receptor activities in the spinal dorsal horn via releasing interleukin-1 beta. **Journal of Neuroinflammation**, USA, v. 12, n. 1, Jan. 2015.

YANG, Huan *et al.* Toll-Like Receptor 4 Prompts Human Breast Cancer Cells Invasiveness via Lipopolysaccharide Stimulation and Is Overexpressed in Patients with Lymph Node Metastasis. **Plos One**, USA, v. 9, n. 10, Out. 2014.

YANG, Liying; FRANCOIS, Fritz; PEI, Zhiheng. Molecular pathways: pathogenesis and clinical implications of microbiome alteration in esophagitis and Barret esophagus. **Clinical Cancer Research**, Nova lorque, v. 18, n. 8, p. 2138-2144, Feb. 2012.

ZHOU, De-Jun *et al.* Submucosal tunneling and endoscopic resection of submucosal tumors at the esophagogastric junction. **World Journal of Gastroenterology**, China, v. 21, n. 2, p.578-583, Jan. 2015.

ANEXO A



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE FARMÁCIA

FFARM.OF.Com.Cient. Nº 07/13

Porto Alegre, 12 de novembro de 2013

Prezado Pesquisador,

A Comissão Científica da Faculdade de Farmácia da PUCRS
apreciou e aprovou seu Projeto de Pesquisa intitulado:

**"Ação dos compostos CpG-ODN e LPS sobre a proliferação de linhagens
celulares de câncer de boca e esôfago"**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pablo Machado
Coordenador Adjunto
Comissão Científica - FFARM

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone

PUCRS

Campus Central
Av. Itália, 6681 - prédio 12, A - sala 202
CEP 90619-900 - Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3512 - Fax (51) 3320-3612
E-mail: farmacia@pucrs.br
www.pucrs.br/farmacia