



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

Avaliação do efeito do cigarro na expressão gênica e proteica em carcinoma epidermoide de cavidade oral: relação do tabagismo com elementos responsivos de hipóxia e estresse oxidativo

MAYARA MOTA DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Madeira Álvares da Silva

VITÓRIA/ES

2021



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

**Avaliação do efeito do cigarro na expressão gênica e
proteica em carcinoma epidermoide de cavidade oral:
relação do tabagismo com elementos responsivos de
hipóxia e estresse oxidativo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e à Rede Nordeste de Biotecnologia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Madeira Álvares da Silva

VITÓRIA/ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M917a Mota de Oliveira, Mayara, 1989-
Avaliação do efeito do cigarro na expressão gênica e proteica em carcinoma epidermoide de cavidade oral : relação do tabagismo com elementos responsivos de hipóxia e estresse oxidativo / Mayara Mota de Oliveira. - 2021.
126 f. : il.

Orientadora: Adriana Madeira Álvares da Silva.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Biotecnologia. 2. Boca - Câncer. 3. Fumantes. 4. Nicotina. 5. Marcadores genéticos. I. Madeira Álvares da Silva, Adriana. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Agradeço as agências de fomento FAPES, CNPq e CAPES que garantiram a manutenção deste estudo até esta etapa de conclusão.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia RENORBIO, junto com os professores e secretária pela oportunidade e auxílio.

Agradeço aos membros da banca por terem aceitado participar deste processo formativo.

Agradeço ao grupo de pesquisa e a Prof. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva pela parceria e orientação nas etapas de execução do trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Patologia Molecular, Laboratório de Biologia de Células Tronco e ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes pela oportunidade, bem como pelo suporte e orientação nas etapas da pesquisa aqui apresentadas.

Agradeço aos meus familiares e amigos pelo suporte e apoio.

Agradeço a Deus por ter me fortalecido e me dado esperança sobre dias melhores.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Marthin Luther King).

RESUMO

O carcinoma epidermoide de cavidade oral (CECO) está associado a elevadas taxas de mortalidade e que tem como principal fator de risco o tabagismo. Em relação ao tabaco, este é composto por mais de 7000 substâncias, entre estas a nicotina. A contribuição da nicotina para a carcinogênese está relacionada à ativação de múltiplas vias de sinalização que também regulam a progressão, o crescimento e metástase de tumores por meio da estimulação dos receptores nicotínicos de acetilcolina (*nAChRs*). Pesquisas evidenciam que a exposição à nicotina pode mimetizar os efeitos da hipóxia e promover a regulação positiva na expressão de genes relacionados à via como HIF-1 α , VEGF-A, FIH, PHD3. Somado a este, os constituintes do tabaco, são responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que perturbam a homeostase celular e promove danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas. Entre os mecanismos de defesa antioxidantes para manutenção da homeostasia e reparo do DNA, um conjunto de proteínas que atuam na redução do estresse oxidativo são mobilizadas, entre essas a proteína superóxido dismutase (SOD) compõem o principal mecanismo de defesa intracelular contra reações oxidativas, e a endonuclease apurínica/apirimidínica/fator redox (APE-1/REF-1) que atua na via de reparo por excisão de bases. Buscou-se com este estudo, entender o papel da nicotina e do tabagismo, por meio do extrato do cigarro (CSE), na expressão de genes e proteínas da via de hipóxia, estresse oxidativo e de reparo em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cavidade oral (SCC-9) e de queratinócitos orais com displasia (DOK), e suas associações com o prognóstico e sobrevida de 137 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral, tabagistas e não tabagistas. Foi demonstrado que CSE tem um maior impacto na redução da migração celular na linhagem DOK, e mobiliza a

expressão de SOD-1 em resposta dependente da concentração, e APE-1/REF-1 em resposta ao tempo de exposição para SCC-9. *In vivo*, o tabagismo contribuiu para a expressão forte de SOD-1, e a sua expressão positiva foi significativamente associada ao tamanho do tumor, diferenciação, além de ser um fator de proteção para uma melhor sobrevida livre de doença. A expressão de APE-1/REF-1 foi associada ao tamanho do tumor e com a sobrevida doença específica. Em relação exposição à nicotina, SCC-9 demonstra ser mais responsiva à modulação celular e resposta à hipóxia e ao estresse oxidativo, com destaque para o aumento da expressão de SOD-1, APE-1/REF-1 e HIF-1 α . Assim, nossos resultados demonstram que o grau de malignidade pode ser uma variável relacionada ao tempo de ativação dos mecanismos celulares de sobrevida global em resposta a ROS e hipóxia em indivíduos tabagistas.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide de cavidade oral. Tabagismo. Nicotina. Hipóxia. Estresse oxidativo. Reparo.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma of the oral cavity (OSCC) is associated with high mortality rates and its main risk factor is smoking. In relation to tobacco, it is composed by more than 7000 substances including nicotine. Nicotine contribution to carcinogenesis is related to the activation of multiple signaling pathways that also regulate the progression, growth, and metastasis of tumors by stimulating nicotinic acetylcholine receptors (*nAChRs*). Nicotine exposure can simulate the effects of hypoxia, and promote up-regulation in the expression of pathway-related genes such as HIF-1 α , VEGF-A, FIH, PHD3. In addition, the constituents of tobacco are responsible for the generation of reactive oxygen species (ROS), which disturb cell homeostasis and promote damage to DNA, RNA, lipids, and proteins. Among the antioxidant defense mechanisms for maintenance of homeostasis and DNA repair, a set of proteins that act to reduce oxidative stress are mobilized. Protein superoxide dismutase (SOD) is the main intracellular defense mechanism against oxidative reactions, and Apurine/aprimidinic endonuclease/redox factor (APE-1/REF-1) acts at the base excision repair pathway. This study aimed to understand the role of nicotine and smoking, through cigarette extract (CSE), in the expression of genes and proteins in the hypoxia, oxidative stress, and repair pathways in cell lines of squamous cell carcinoma of the cavity oral (SCC-9) and oral keratinocytes with dysplasia (DOK), and their associations with the prognosis and survival of 137 patients with OSCC, smokers and non-smokers. Cigarette Smoke Extract (CSE) has been shown to have a greater impact on reducing cell migration in the DOK lineage, and mobilizes SOD-1 expression in concentration-dependent response, while APE-1/REF-1 show a different kind of regulation being the response time-dependent in SCC-9 cells. *In vivo*, smoking contributed to the

strong expression of SOD-1, and its positive expression was significantly associated with tumor size, differentiation, in addition to being a protective factor for better disease-free survival. APE-1/REF-1 expression was associated with tumor size and disease-specific survival. Regarding nicotine exposure, SCC-9 demonstrates to be more responsive to cellular modulation and response to hypoxia and oxidative stress, with exhibiting on the increased expression of SOD-1, APE-1/REF-1, and HIF-1 α . Together, our findings demonstrate that the degree of malignancy may be a variable related to the time of activation of cellular mechanisms of overall survival in response to ROS and hypoxia in smokers.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Smoking. Nicotine. Hypoxia. Oxidative stress. repair.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS

UFES

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas.

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade Federal do Espírito Santo a publicar em ambiente digital institucional, sem ressarcimento dos direitos autorais previstos na Lei nº 9.610/98 e em outras que regulem ou vierem a regular a matéria, o texto integral da obra abaixo citada, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura e/ou impressão, a título de divulgação da produção científica brasileira.

Tipo de documento: () Dissertação () Tese
Nome autor:
Vínculo empregatício:
Identificador único de autor (https://orcid.org/signin - cadastramento gratuito): ORCID
Telefone para contato:
E-mail: Pode ser disponibilizado? () sim () não
Título:
Nome do programa de pós-graduação:
Nome Orientador: ORCID:
Nome Co-orientador: ORCID:
Nome Co-orientador: ORCID:
Membro da banca:
Membro da banca:
Membro da banca:
Membro da banca:
Membro da banca:
Data de Defesa: ____/____/____
Área do conhecimento (conforme tabela do CNPq - http://www.cnpq.br/documents/10157/186158/TabeladeAreasdoConhecimento.pdf)
Palavras-chave (máximo 5):



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS

UFES

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas.

Agência de Financiamento:

CAPES CNPq FAPES Outra: _____

Tipo de acesso:

Livre¹ Restrito² Embargo³ – ____ anos.

Orientações:






1 Não existe restrições quanto ao acesso.

2 O acesso está condicionado à identificação (login) no repositório.

3 Documentos com acesso embargado por tempo determinado. Informe o período de embargo na lacuna.

Tipo de Licença Creative Commons (CC). Este tipo de licença permite que o próprio autor sem intervenção de intermediários (ex.: advogados) informe às pessoas como elas devem utilizar a sua obra sem pedir autorização prévia.

Se você adotar a Licença Creative Commons marque uma das opções abaixo:

X	ESQUEMA	CONTEÚDO
<input checked="" type="checkbox"/>		Atribuição – CC BY. Sem reservas em relação ao uso, inclusive para comercialização.
<input type="checkbox"/>		Atribuição-Compartilha Igual – BY-SA. Permite a remixagem, adaptação e criação a partir do seu trabalho. Para fins comerciais e não comerciais deve ser atribuído crédito e licença sob termos idênticos do original.
<input type="checkbox"/>		Atribuição- SemDerivações – CC BY-ND. Permite a redistribuição comercial e não comercial desde que não seja alterado no seu todo e o crédito seja atribuído ao autor.
<input type="checkbox"/>		Atribuição-NãoComercial – CC BY NC. Permite remixagem, adaptação e criação para fins não comerciais, com atribuição de crédito aos novos trabalhos que não precisam ser licenciados nos mesmos termos.
<input type="checkbox"/>		Atribuições-SemDerivações-SemDerivados – CC BY-NC-ND. Mais restritiva da licenças, só permite o download dos trabalhos e o compartilhamento com atribuição de crédito do autor.

Local: _____ Data: ____ / ____ / ____.

Assinatura do autor:

fayam ufes de O.