

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Rogério Gonçalves da Rocha

Ação da leptina sobre o efeito terapêutico da radiação ionizante e mecanismos de degradação proteolítica no carcinoma epidermoide de boca

Montes Claros  
2017

Rogério Gonçalves da Rocha

Ação da leptina sobre o efeito terapêutico da radiação ionizante e mecanismos de degradação proteolítica no carcinoma epidermoide de boca

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e aspectos clínicos das doenças.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucyana Conceição Farias

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães

Montes Claros  
2017

R672a Rocha, Rogério Gonçalves da.  
Ação da leptina sobre o efeito terapêutico da radiação ionizante e mecanismos de degradação proteolítica no carcinoma epidermóide de boca [manuscrito] / Rogério Gonçalves da Rocha. – 2017.  
80 f. : il.

Inclui Bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros -

Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2017.

Orientadora: Profa. Dra. Lucyana Conceição Farias.

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães.

1. Carcinoma epidermóide de boca. 2. Leptina. 3. Radiação ionizante. 4. Sistema Ubiquitina – proteassomo. 5. Proliferação. 6. Migração. I. Farias, Lucyana Conceição. II. Guimarães, André Luiz Sena. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: Professor João dos Reis Canela

Vice-reitor: Professor Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Professor Virgílio Mesquitas Gomes

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres C. L. de Almeida

Coordenadoria de Iniciação Científica: Afrânio Farias de Melo

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-Graduação: Professor Hercílio Martelli Júnior

Coordenadoria de Pós-Graduação *Lato sensu*: Felipe Fróes Couto

Coordenadoria de Pós-Graduação *Stricto sensu*: Idenílson Meireles Barbosa

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenadora: Marise Fagundes Silveira

Subcoordenador: Luiz Fernando Rezende



MESTRANDO(A): ROGÉRIO GONÇALVES DA ROCHA.

TÍTULO DO TRABALHO: "Ação da leptina sobre o efeito terapêutico da radiação ionizante e mecanismos de degradação proteolítica no carcinoma epidermóide de boca".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças.

**BANCA (TITULARES)**

PROF. DR. LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS, ORIENTADOR/PRESIDENTE

PROF. DR. ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

PROF. DR. JOÃO MARCUS OLIVEIRA ANDRADE

PROF. DR. TALITA ANTUNES GUIMARÃES

**ASSINATURAS**

**BANCA (SUPLENTES)**

PROF. DR. MARCOS VINÍCIUS MACEDO DE OLIVEIRA

PROF. DR. SERGIO HENRIQUE SOUSA SANTOS

**ASSINATURAS**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

APROVADA      [ ] REPROVADA

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me incentivou a percorrer os caminhos que levam à sabedoria.

Sr. Aurelino Gonçalves da Rocha, Sr<sup>a</sup>. Rosane Gonçalves da Rocha, Sr<sup>a</sup> Joana Cordeiro da Rocha, Sr. Santos Gonçalves da Rocha (*in memorian*) e esposa Roseane Barbosa Oliveira Rocha.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por cada dia de minha existência e por me ajudar nos momentos de angústia, aflição, tristeza, dor e alegria, sentimentos ao qual sei que apoiado pela fé, encontro resiliência para solucionar os percalços da vida, inerentes ao ser humano.

À minha mãe Rosane pelo incentivo, esforço e sabedoria para educar e conscientizar quanto ao significado que o estudo possui para o crescimento do indivíduo em sociedade. Sou grato, pois minha mãe foi o caminho que DEUS escolheu para que eu chegasse até aqui.

À meu pai Aurelino que sempre ofereceu o melhor diante da nossa condição para que eu pudesse chegar até o dia de hoje. Sei que ele sempre pensará primeiramente na família antes de tudo. Queria ser 10% do que ele é, pois certamente saberia que as pessoas ao meu lado estariam muito melhores; é um dos maiores exemplos que eu tenho na vida como homem.

À minha avó Joana, que certamente não foi possível estudar diante das condições da época. Fez de tudo para se manter perseverante até os dias de hoje. É uma das pessoas mais inteligentes e sábias que eu tenho a honra de conviver. Sou grato, pois graças a ela e ao meu avô, estou aqui hoje; eles são extremamente educados, mostrando que educação vai muito além do que possamos imaginar.

À meu avô Santos Gonçalves da Rocha (*in memoriam*), exemplo de homem para minha família, para meu pai e certamente para mim. Tive a honra de viver ao seu lado até que DEUS o levou. Sei que foi para um lugar melhor que este. Faz muita falta a nós aqui na Terra; penso no abraço que não pude dar antes de sair do hospital, mas que um dia darei, pois sei que uma pessoa assim não deixa de existir. A minha fé que vou o encontrar é grande.

À Roseane (Zi); quando entrei neste programa, chamava-se Roseane Barbosa Oliveira e, agora, tem meu sobrenome. É uma pessoa que encontrei para viver por toda a vida; sei que estará comigo sempre independente das dificuldades. Quando a conheci, sabia que seria uma mulher extraordinária; eu a conheço há muitos anos e para todo o sempre. Não há ninguém na Terra a não ser minha família e Roseane, que aguentaria a minha chatice por tanto tempo assim. Espero que eu possa ser como meu avô e como meu pai foi para a família.

À minha orientadora: Lucyana Conceição Farias, por me orientar (aturar)...o quanto chato eu sou. Sou extremamente grato por abrir as portas do conhecimento. Nunca esquecerei o dia que estava subindo a escada do pronto socorro, provavelmente esqueceu, mas eu não. Foi o dia que eu conversei com você, quando estava correndo para o seu gabinete, como sempre, muito dedicada. Conversei às pressas e disse que poderia tentar a prova para sua orientação. Aquele dia, nunca esquecerei; não conhecia muitas pessoas no laboratório naquela época, além da

MAGDA, CARLOS, MARCOS, CAMILA e a PATRÍCIA. Sou extremamente grato por você sempre me ensinar, proporcionando-me vários conhecimentos acerca deste assunto “neoplasia”, que é tão complexo. Vou ser sincero, são matérias muito difíceis, mas mesmo assim você faz o melhor, tentando me explicar de uma maneira mais clara. Estarei à disposição de todos os professores que passaram pela minha vida; são vocês que fazem uma pessoa ter esperança e ter sonhos. Há sempre um professor fazendo o seu melhor, apesar da falta de incentivo do governo ao profissional, que tanto faz pela sociedade.

Ao professor André Luiz Sena Guimarães, com o seu jeito verdadeiro, que sempre fala o que pensa, mas não engana ninguém. É um ser humano extraordinário, possui um conhecimento enorme. Meu avô era assim, falava o que pensava. Algumas pessoas não entendem, mas sei que falamos o que pensamos com pessoas que queremos que cresçam, já que a vida não é fácil para ninguém.

À Magda que foi pioneira no incentivo para eu entrasse no programa. Fez aflorar uma vontade que já existia. Posteriormente, a vida se encaminhou através de um episódio juntamente com Júnior, a tornar o tão sonhado desejo uma concretização. Obrigado Magda, sou extremamente grato por isso.

Aos amigos e colegas que fiz no programa: Emisael, Andreia, IC Amanda, Karine, Sabrina, Marcela, Eloá, Amanda (B), Daniel, Luiz, Lilian, Alana, Deborah, Janaína, Jaciara, Daniela, Guilherme, Tayslla, dentre outros. Tento ter uma boa convivência com todos e poder contribuir sempre.

Sou grato a todos que me ensinaram algo, pois o conhecimento quando é multiplicado causa transformações, tanto para o mestre, quanto para o aprendiz. Agradeço à Sabrina, Marcela e Eloá por terem me ensinado muitas técnicas e conhecimentos e, às vezes, me acompanhando em outras técnicas. Aprendemos muitas coisas juntos. Ao Emisael por ter me recebido no laboratório e me apresentado a todos. Espero que eu tenha contribuído! Ao Carlos por também ter me incentivado a entrar no programa de mestrado. Ele é um exemplo a ser seguido. A Talita e Eliane, por terem me ensinado uma variedade de experimentos. Sou muito grato a vocês!

Agradeço a todos, com os mais sinceros e profundos afetos aqui expressados. Foi uma passagem épica para mim. Serei grato por cada momento. Tentarei sempre contribuir no que estiver ao meu alcance, para melhorar o meu entorno social. Obrigado! Os momentos com todos foram extraordinários.



## RESUMO

A leptina (Lep), hormônio que atua na regulação do balanço energético e controle do peso corporal, pode estar envolvida no desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de neoplasias. No carcinoma epidermoide de boca (CEB), a via de sinalização da leptina foi associada a alterações no fenótipo neoplásico e aumento na expressão de genes relacionados à proliferação, invasão e angiogênese. As evidências indicam que pacientes com carcinoma epidermoide na região de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia apresentam redução dos níveis de leptina após tratamento. No entanto, não é bem entendido se o aumento dos níveis de leptina é capaz de interferir sobre o efeito do tratamento antineoplásico. Além da via de sinalização da leptina, o sistema ubiquitina-proteassoma, responsável mecanismos de degradação proteolítica, tem despertado interesse para a investigação no campo da carcinogênese de boca. Esse dois alvos foram adotados como foco de estudo, uma vez que ambos estão envolvidos nos mecanismos de proliferação neoplásica e desregulação do ciclo celular. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo investigar a ação da leptina sobre o efeito terapêutico da radiação ionizante e mecanismos de degradação proteolítica no CEB. Para isso, foram delineadas duas abordagens de estudo. Na primeira abordagem, a partir de ensaios *in vitro* e moleculares, foi testada a hipótese de que a leptina pode comprometer o efeito da radiação ionizante e comportamento de células de CEB. As linhagens imortalizadas, SCC4 e SCC9, foram tratadas com leptina recombinante humana, e expostas a 6Gy de radiação produzidos pelo cobalto-60. Para a análise fenotípica, foram realizados ensaios de proliferação celular, morte, migração e ensaio clonogênico. O perfil molecular foi investigado através da análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e análise proteômica, por meio de espectrometria de massa. A leptina promoveu redução da morte celular e aumento da proliferação celular, migração e formação clonogênica, apesar dos efeitos supressores induzidos pela radiação ionizante. Além disso, foi associada a uma redução significativa do acúmulo intracelular de EROs, e ao aumento na expressão de proteínas relacionadas a eventos da carcinogênese, como ACTC1, KRT6A e EEF2, em células irradiadas. Uma segunda abordagem foi proposta visando investigar se a leptina pode modular a expressão gênica de componentes do sistema ubiquitina-proteassoma e comportamento neoplásico em células de CEB. A partir de simulações bioinformáticas, considerou-se a hipótese de que a leptina estabelece interações com componentes do sistema ubiquitina-proteassoma. As linhagens de células de CEB foram tratadas com leptina e os níveis de expressão de genes do sistema ubiquitina-proteassoma foram quantificados através de qRT-PCR, incluindo USP2, UBA,

UBC, PSMD4 e PSME3. Os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. A análise *in silico* mostrou um possível mecanismo de ativação de USP2 pela leptina. Os resultados revelaram que a leptina favoreceu o fenótipo neoplásico, em concordância com o aumento na expressão dos genes envolvidos no mecanismo de degradação proteassomal. As células tratadas com leptina apresentaram superexpressão do oncogene USP2 e genes regulatórios do ciclo celular, UBA e UBC. Os genes PSME3 e PSMD4 não foram alterados pelo tratamento. com a leptina. Os achados apontam a leptina como um fator importante que compromete a responsividade de células de CEB à radiação ionizante terapêutica, reduzindo seus efeitos supressivos sobre o fenótipo neoplásico e aumentando a expressão de genes importantes envolvidos na carcinogênese. Destaca-se, ainda, que a leptina pode modular a expressão de componentes do sistema de ubiquitina-proteassoma, sugerindo esta associação como um fator que pode modificar o comportamento neoplásico das células de CEB. No entanto, análises funcionais e ensaios *in vivo* são necessários para melhor entender o impacto biológico dessa conexão de mecanismos na carcinogênese de boca, bem como a real importância da leptina em eventos moleculares relacionados aos efeitos da radiação no câncer bucal.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide de boca. Leptina. Radiação ionizante. Sistema Ubiquitina-proteassomo. Proliferação. Migração

## ABSTRACT

Leptin, a hormone that regulates energy balance and body weight control, can be involved in the development and progression of different cancer types. In oral squamous cell carcinoma (OSCC), the leptin signaling pathway was associated with changes in the neoplastic phenotype and increased expression of genes related to proliferation, invasion and angiogenesis. Evidence indicates that patients with squamous cell carcinoma in the head and neck submitted to radiotherapy show the reduced levels of leptin after treatment. However, it is not well understood whether increased levels of leptin are able to interfere with the effect of antineoplastic treatment. In addition to the leptin signaling pathway, the ubiquitin-proteasome system, responsible for proteolytic degradation mechanisms, has been of interest target for research in the field of oral carcinogenesis. These two targets were adopted as the focus of study, since both are involved in the mechanisms of neoplastic proliferation and cell cycle deregulation. In this context, this study aimed to investigate the action of leptin on the therapeutic effect of ionizing radiation and mechanisms of proteolytic degradation in CEB. For this, two study approaches were outlined. In the first approach, through *in vitro* assays, we hypothesized that leptin may compromise the effect of ionizing radiation and behavior of OSCC cells. The immortalized cell lines, SCC4 and SCC9, were treated with recombinant human leptin, and exposed to 6Gy of radiation produced by cobalt-60. For phenotypic analysis, the cell proliferation, death, migration and clonogenic assays were performed. The molecular profile was investigated through the analysis of reactive oxygen species (ROS) levels, and proteomic analysis by means of mass spectrometry. Leptin promoted reduction of cell death and increased cell proliferation, migration and clonogenic formation, despite the suppressive effects induced by ionizing radiation. In addition, it was associated with a significant reduction of intracellular accumulation of ROS, and increased expression of proteins related to carcinogenesis events, such as ACTC1, KRT6A and EEF2, in irradiated cells. A second approach was proposed to investigate whether leptin can modulate the gene expression of ubiquitin-proteasome system components and neoplastic behavior in OSCC cells. Through bioinformatic simulations, it was hypothesized that leptin establishes interactions with components of the ubiquitin-proteasome system. The OSCC cell lines were treated with leptin and the levels of mRNA expression of the ubiquitin-proteasome system components were quantified through qRT-PCR, including USP2, UBA, UBC, PSMD4 and PSME3. The cell viability and death tests were performed. The *In silico* analysis showed a possible mechanism of activation of USP2 by leptin. The results revealed that leptin favored

the neoplastic phenotype, according with the increase in the expression of the genes involved in the mechanism of proteasomal degradation. The cells treated with leptin showed overexpression of the oncogene USP2 and regulatory genes of the cell cycle, UBA and UBC. The proteasomal genes PSME3 and PSMD4 were not altered by treatment. Our findings points the leptin as an important factor impairing the responsivity of OSCC cells to the ionizing radiation, reducing its suppressive effects on the neoplastic phenotype, and increasing protein expression of important genes involved in carcinogenesis pathway. We highlight yet that leptin can modulate the gene expression of ubiquitin-proteasome system components, suggesting this association as an important factor modifying the behavior of OSCC cells. However, functional analysis and *in vivo* assays are necessary in order to better understand the biological impact of this mechanisms connection in oral carcinogenesis. Thus, functional analyzes and *in vivo* assays are needed to better understand the biological impact of this mechanism binding on oral carcinogenesis, as well as the real importance of leptin in molecular events related to the radiation on oral cancer cells.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Leptin. Ionizing radiation. Ubiquitin-proteasome system. Proliferation. Migration

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fatores associados à etiopatogênese do câncer de boca.....	22
Figura 2. Principais características do microambiente tumoral, fatores de proliferação, angiogênese e invasão, aspectos de degradação de matriz extracelular.....	24
Figura 3. Leptina promove proliferação, migração e sobrevivência celular pela via STAT3, PI3K, ERK1 e ERK2.....	26
Figura 4. Ligação da leptina com o receptor LepR, atuação em NFkB, proliferação, migração e angiogênese.....	27
Figura 5. Complexo proteassoma complexo 26S e subunidades 20S e 19S.....	28
Figura 6. Usp2 modula a degradação de ciclina D1, que atua na via de progressão e parada do ciclo celular.....	30
Figura 7. Mecanismo de atuação da radioterapia.....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição proporcional estimada dos dez tipos de câncer mais incidentes na população brasileira para 2016, por sexo, exceto pele não-melanoma.....	20
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1
AKT	Protein Kinase
ATM	Ataxia telangiectasia mutado
CCND1	Ciclina D1
CDK	Cyclin-dependent kinase
CEB	Carcinoma Epidermoide de Boca
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EEF2	Eukaryotic elongation factor 2
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracelular-signal-regulated kinases
HPV	Human Papiloma Virus
JAK	Janus Kinase
KRT6A	Keratin 6A
Lep	Leptin (Leptina)
LepR	Leptin-Receptor (Receptor de Leptina)
MMP-2	Metaloproteinase 2
MMP-9	Metaloproteinase 9
NF-KB	Factor nuclear kappa B
P53	Tumor Protein
P16	Multiple tumor suppressor 1
P27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PI3k	Phosphoinositide 3-kinase
PSMD4	Proteasome non-ATPase regulatory subunit 4
PSME3	Proteasome activator subunit 3
ROS	Reactive oxygen species
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
UBA	Ubiquitin A
UBC	Ubiquitin C
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
3.1 Carcinoma Epidermoide de Boca.....	19
3.1.1 Aspectos Gerais .....	19
3.1.2 Etiopatogênese .....	21
3.1.3 Proliferação, migração, angiogênese, invasão e morte celular: mecanismo no carcinoma epidermoide de boca.....	23
3.2 Leptina: Aspectos gerais e mecanismos e ação na carcinogênese.....	25
3.3 Sistema ubiquina-proteassomo e carcinogênese de boca.....	28
3.4. Radiação ionizante como estratégia terapêutica para o carcinoma epidermoide de boca.....	31
4 PRODUTOS .....	34
4.1 Artigo 1: Leptin impairs the therapeutic effect of ionizing radiation in oral squamous cell carcinoma cells .....	35
4.2 Artigo 2: Leptin modulates expression of ubiquitin-proteasome system components in oral squamous cell carcinoma cells: a preliminary study.....	63
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
REFERÊNCIAS .....	77
ANEXOS .....	83



## 1 INTRODUÇÃO

O estudo dos mecanismos relacionados às enfermidades de boca, especialmente o carcinoma epidermoide, tem sido foco de grande interesse científico, seja pela busca do entendimento de sua patogenia ou pela investigação de novas abordagens para o tratamento (1-3).

O carcinoma epidermoide de boca (CEB) apresenta caráter agressivo, podendo levar a um comprometimento importante na qualidade de vida dos indivíduos acometidos, influenciando as taxas de sobrevivência (4). Nesse sentido, torna-se fundamental a investigação de fatores intrínsecos ao organismo, que podem influenciar sobre a resposta terapêutica, favorecendo, assim, uma maior compreensão do comportamento dessa neoplasia frente aos tratamentos adotados, como a radioterapia (5, 6).

Dentre a diversidade de fatores associados à etiopatogênese do CEB, tais como os de natureza genética, epigenética e ambiental (7, 8), dois mecanismos moleculares foram alvo desse estudo, destacando o sistema ubiquitina-proteassomo e a leptina, especialmente por compartilharem efeitos comuns sobre as células neoplásicas de boca, favorecendo desregulações no ciclo celular e induzindo um aumento na atividade proliferativa (9, 10).

Na carcinogênese de boca, há uma escassez de estudos sobre a real importância do sistema ubiquitina-proteassomo; foi demonstrado um papel oncogênico de um dos componentes desse sistema, a proteína USP2, revelando uma associação com a presença de metástase locorregional (11).

A leptina tem sido foco de estudos sobre a carcinogênese de boca (12, 13). Esse hormônio foi relacionado à progressão e metástase em vários tipos de neoplasias (14, 15), promovendo, ainda, diferentes processos neoplásicos, como a proliferação, migração e a angiogênese tumoral (16, 17). No entanto, sua ação interferindo sobre os mecanismos moleculares da radiação ionizante terapêutica não foram explorados na carcinogênese de boca. Além disso, não há um conhecimento sobre uma possível associação entre a leptina e mecanismos de degradação proteolítica promovida pelo sistema ubiquitina-proteassoma, favorecendo o aumento da proliferação neoplásica em células de CEB. Sendo assim, esse foco de estudo representa uma abordagem interessante para investigação, buscando um maior entendimento

sobre os eventos moleculares que comprometem a resposta terapêutica de células de CEB, e maiores esclarecimentos sobre novos eventos moleculares envolvidos na patogênia da doença.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação da leptina sobre o efeito terapêutico da radiação ionizante e mecanismos de degradação proteolítica no carcinoma epidermoide de boca

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram delineados com a finalidade de responder os questionamentos principais, relacionados a seguir. Cada questionamento possibilitou a elaboração de um produto científico desta dissertação

A) A leptina interfere sobre o efeito terapêutico da radiação ionizante em células de CEB?

- Investigar o efeito da Lep sobre fenótipos de linhagens celulares de CEB, incluindo a proliferação, migração, morte celular e formação clonogênica, em células de CEB expostas à radiação ionizante.
- Avaliar se a leptina modifica o proteoma de células de CEB expostas à radiação ionizante.

B) A leptina pode modular a expressão de componentes do sistema ubiquitina-proteassomo e comportamento neoplásico de células de CEB?

- Delinear rede de interações *in silico* entre leptina e principais componentes do sistema ubiquitina-proteassomo;
- Investigar se a leptina altera o a proliferação e morte de células de CEB, em paralelo a alterações na expressão gênica de componentes do sistema ubiquitina-proteassomo, incluindo USP2, UBA, UBC, PSMD4 e PSME3.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Carcinoma Epidermoide de Boca


##### 3.1.1 Aspectos Gerais

O carcinoma epidermoide de boca (CEB), também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, é uma das neoplasias mais frequentes na cavidade bucal, correspondendo a aproximadamente 90% das lesões bucais malignas. A doença é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, acometendo em maior número indivíduos do sexo masculino e com idade superior a 60 anos, sendo de aproximadamente 2,5:1 a proporção entre homens e mulheres (18). Estima-se que as maiores taxas da doença no sexo masculino possam ser devido à maior exposição aos fatores de risco, como tabaco e álcool (19-22).

Cerca de 300 mil novos casos de câncer de boca são diagnosticados a cada ano, causando mais de 120.000 mortes no mundo (1, 23).

No Brasil, o câncer, juntamente às doenças cardiovasculares, é uma das principais causas de morte (33). As estimativas dos Registros de Base Populacional Brasileira apontaram, para o biênio 2016-2017, a ocorrência de cerca de 420 mil casos novos de câncer, excluindo um número aproximado de 180 mil casos novos de câncer de pele não melanoma (24). No que se refere ao câncer de boca, os dados mostraram, no ano de 2016, a estimativa de 11.149 casos novos em homens, e 4.350 em mulheres (24). A distribuição dos novos casos da doença é heterogênea nas diferentes regiões do país, com a maior concentração de casos nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste. Nesse perfil epidemiológico, no sexo masculino, o câncer de próstata representa os maiores índices de acometimento, sendo que o câncer bucal ocupa a 5ª posição. Em mulheres, o câncer de mama é o mais prevalente; o câncer bucal coloca-se na 12ª posição (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição proporcional estimada dos dez tipos de câncer mais incidentes na população brasileira para 2016, por sexo, exceto pele não-melanoma\*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%		<b>Homens</b> <b>Mulheres</b>	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde, 2015

O CEB pode apresentar-se, clinicamente, como uma área leucoplásica ou eritroplásica, úlceras endurecidas ou tumores com margens exofíticas proeminentes (25). A língua é o sítio anatômico mais acometido, particularmente a superfície posterior-lateral, seguido pelo assoalho da boca, palato mole, área retromolar e a gengiva (25).

Alguns tipos de neoplasias, dentre elas o CEB, podem se desenvolver a partir de lesões displásicas, com potencial para malignização (26). A carcinogênese de boca é um processo complexo, onde se evidencia a ocorrência de inúmeras alterações genéticas e epigenéticas que possibilitam a transformação de células biologicamente normais em células funcionalmente alteradas, no que se refere a desregulações da proliferação celular e à invasividade nos tecidos adjacentes e/ou a distância (25, 27).

Apesar dos avanços no tratamento de indivíduos com CEB, a taxa de sobrevivência em 5 anos permanece em aproximadamente 50% dos casos. Sendo assim, é de extrema importância a detecção precoce do câncer bucal, podendo contribuir sobremaneira para a redução da morbimortalidade dos indivíduos acometidos pela doença (28).

### 3.1.2 Etiopatogênese

A etiopatogênese do CEB é atribuída a fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, especialmente àqueles relacionados ao estilo de vida do indivíduo, como o tabagismo e etilismo (4, 29, 30)

O mecanismo da carcinogênese bucal envolve a ocorrência de uma série de alterações genéticas, tais como ativação dos oncogenes *EGFR*, *ciclina D1*, *COX-2*, e inativação, mutações ou perdas alélicas em genes supressores de tumor, como *TP53*, *p16*, *p27* e *WAF1/CIP1*. A superativação de fatores angiogênicos, aumento da expressão de metaloproteinasas relacionadas à invasividade tumoral, bem como polimorfismos genéticos também representam fatores genéticos relevantes para patogênese da doença (5, 29, 31-33)

A ação de oncogenes na carcinogênese de boca é bem estabelecida na literatura (34, 35). Esses são derivados de alterações em proto-oncogenes, que codificam proteínas responsáveis por sinais positivos para a proliferação e/ou sobrevivência celular. Nesse processo, um proto-oncogene alterado e anormalmente ativado torna-se um oncogene, podendo promover a proliferação celular anormal e levar à tumorigênese. Alguns dos mecanismos comuns de ativação de oncogenes incluem mutações, translocações cromossômicas, amplificação gênica e inserção retroviral (31). Muitos oncogenes são associados ao CEB (36), como os genes *EGF*, *c-myc*, *FGF* e *WNT* (34, 35, 37, 38).

Desregulações em genes supressores de tumor desempenham um papel crucial na patogênese do CEB (36, 39). A ocorrência de mutações, perdas alélicas ou alterações epigenéticas em tais genes favorecem a proliferação celular descontrolada, contribuindo para o fenótipo maligno (31). Um importante fator associado à etiologia do CEB é a mutação do gene *TP53* (40, 41). Foi demonstrada uma associação entre superexpressão da proteína P53 mutada, recorrência tumoral e prognóstico desfavorável em pacientes acometidos pelo CEB (42).

Alterações epigenéticas são associadas à etiopatogênese do CEB. Mecanismos epigenéticos podem influenciar a desregulação da expressão gênica, a partir de metilação de DNA, modificações de histonas e expressão alterada de micro RNAs (miRNAs) oncogênicos. Tais

eventos epigenéticos desempenham um papel crucial nos eventos de silenciamento gênico de genes supressor de tumor, que favorece desenvolvimento e progressão da doença (43).

O sistema Ubiquitina-proteassomo, mecanismo de degradação proteolítica de maneira ATP-dependente, também atua sobre os eventos moleculares promotores da carcinogênese (44). Evidência sugere que a expressão aumentada de uma enzima componente desse sistema, a desubiquitinase USP2a foi associada a estágios mais avançados do CEB; no entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo não foram elucidados (11).

Aspectos relacionados ao estilo de vida, como o uso do álcool, hábito de fumar, ou a combinação dos dois representam fatores importantes para o desenvolvimento e progressão do CEB. O álcool promove uma maior permeabilidade da mucosa bucal, deixando-a mais susceptível à ação de nitrosaminas e, com isso, uma maior probabilidade de desenvolvimento de lesões potencialmente malignizáveis (45). O álcool diminui os níveis de expressão de *ALDH2*, e a menor expressão deste gene demonstrou diminuição significativa na taxa de sobrevivência dos pacientes acometidos pela doença (46).

O tabaco é considerado um fator importante na etiopatogênese do CEB, já que o seu principal componente, a nicotina, interfere em vias moleculares moduladoras do ciclo celular, promovendo a proliferação e invasão de células tumorais, enquanto inibe a apoptose (19, 47).

A Figura 1 demonstra os principais fatores e seus mecanismos de ação, envolvidos na etiopatogênese do câncer bucal (48).

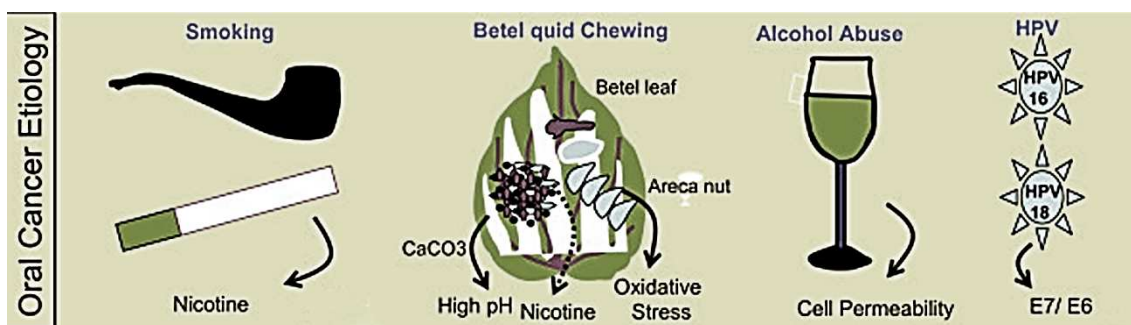


Figura 1. Fatores associados a etiopatogênese do câncer de boca.  
Fonte: Adaptado de MISHA, 2010

O papilomavírus humano HPV é descrito como um fator viral envolvido na patogenia do CEB. O HPV tipo 16 é capaz de induzir a degradação da proteína supressora de tumor P53 através da via de degradação proteolítica (49). Sugere-se que tal mecanismo é promovido pela ação das oncoproteínas virais E5, E6 e E7, modulando, assim, o comportamento proliferativo (50).

### 3.1.3 Proliferação, migração, angiogênese, invasão e morte celular: mecanismos envolvidos no carcinoma epidermoide de boca

A proliferação celular é uma das características cruciais do fenótipo neoplásico. Na carcinogênese, o comportamento proliferativo encontra-se desregulado e, por isso, o entendimento sobre os mecanismos reguladores do ciclo celular é um importante parâmetro para a compreensão do mecanismo patológico de neoplasias (51).

O processo de proliferação celular em diversas neoplasias é favorecido pela fosforilação envolvendo um complexo formado por ciclinas e quinases dependentes de ciclina, sendo essas proteínas consideradas como uma engrenagem do ciclo celular (52, 53). O controle da proliferação está associado à ativação e inibição do ciclo celular. O mecanismo de desativação do processo proliferativo é baseado em sistemas de transdução de sinais negativos que podem fazer com que o ciclo pare, até que sejam restabelecidas condições favoráveis para a mitose. Quando o equilíbrio mitogênico está negativamente regulado, proteínas impedem, temporariamente, a iniciação do ciclo ou a sua progressão, inibindo as quinases dependentes de ciclinas. Ao contrário, quando o mecanismo for positivo, as proteínas que regulam o ciclo permitem a ativação de quinases dependentes de ciclina (52, 53). Porém, na carcinogênese esse equilíbrio proliferativo é quebrado e há descontrole do processo de equilíbrio proliferativo. Expressão aumentada da proteína ciclina D1 foi associada ao desenvolvimento do CEB, favorecendo a proliferação celular e revelando um valor prognóstico (54).

Os constituintes celulares e moleculares do microambiente tumoral permitem as células neoplásicas utilizarem mecanismos de modo a ativar o processo migratório; por isso os esforços são vários para controlar quadros de metástase no cenário clínico (55). O fenótipo



invasivo dessas células é favorecido pela capacidade de secreção de proteases, que atuam degradando, gradualmente, sua matriz extracelular circundante (56).

Durante o processo de desenvolvimento da carcinogênese, o tecido adjacente sofre várias alterações, como lise do estroma com degradação da matriz por metaloproteinasas, fato esse considerado o caminho preparatório para a invasão tumoral (56, 57). Adicionalmente, tal estrutura pode ter um papel mais ativo durante a carcinogênese, por induzir a angiogênese e a produção de fatores de crescimento, estimulando, dessa forma, a proliferação das células neoplásicas (58). A Figura 2 apresenta alguns dos mecanismos relacionados ao microambiente tumoral (59).

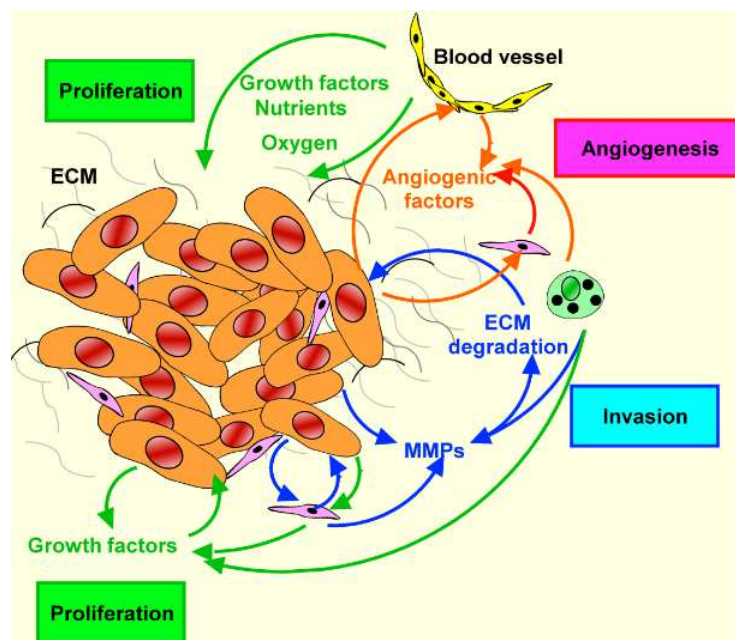


Figura 2. Principais características do microambiente tumoral, fatores de proliferação, angiogênese e invasão, aspectos de degradação de matriz extracelular.

Fonte: Adaptado de KOONTONGKAEW, 2013

A progressão do CEB sofre uma vasta ação do mecanismo da angiogênese. A formação de novos vasos (neovascularização) geralmente mostra-se aumentada na displasia epitelial e no carcinoma epidermoide em relação à mucosa normal (60). Um dos fatores no processo de angiogênese é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que se liga ao fator de crescimento vascular endotelial receptor 1 (VEGFR-1) e ao fator de crescimento vascular endotelial receptor 2 (VEGFR-2), esses receptores ativam vias envolvidas na diferenciação,

migração de células endoteliais, além da proliferação vascular, portanto desempenha papel chave na angiogênese de tumores, já que foi demonstrado que (VEGF), apresentou-se menos expressos em carcinomas epiteliais moderadamente diferenciados em comparação a carcinoma espinocelular invasivos, portanto é evidente que (VEGF) participa no processo de angiogênese no CEB (61).

As características ligadas ao potencial invasivo das neoplasias estão associadas à degradação da matriz extracelular pelas células neoplásicas, proliferação e migração de células endoteliais, diferenciação e formação de anastomoses capilares (62-64). As metaloproteinases de matriz-2 e metaloproteinases de matriz -9 (MMP-2, -9), estão associadas à degradação da matriz extracelular e envolvidas no processo de invasão celular (65). A capacidade das células malignas destruírem a membrana basal e os alguns componentes da Matriz extracelular, esse fato relaciona-se ao potencial invasivo e metastático das neoplasias (66).

Conhecer vias que podem influenciar nos mecanismos migratório, proliferativo e invasivo, é necessário, pois novos conhecimentos são de extrema avalia para agregar novas informações sobre o CEB e teoricamente fornecer entendimento para possíveis mecanismos de ação.

### 3.2 Leptina: Aspectos gerais e mecanismos e ação na carcinogênese

A Leptina é um hormônio de 16 Kilodaltons (KD), descoberto em 1994 (67). É reconhecido pela sua influência no balanço energético e encontra-se aumentado em indivíduos obesos. Esse hormônio atua através do receptor de leptina (LEPR), também denominado OBR, gene que está localizado no cromossomo 1 (1p31), constituído por 18 exons e 17 introns, (OBR); codifica uma proteína que consiste em 1162 aminoácidos. O receptor da leptina é localizado em maior número no hipotálamo e no cerebelo. O receptor de leptina é expresso em outros tecidos como: fígado, rim, pulmão, músculo esquelético e medula óssea, estômago e placenta (68-70).

A leptina tem sido amplamente estudada pela sua influência na obesidade. No entanto, estudos mostram um papel importante desse hormônio, bem como de sua via de sinalização nos mecanismos da carcinogênese. Foi demonstrado que a leptina pode estimular a

proliferação e inibir a apoptose em células de adenocarcinoma esofágico (71) e câncer de boca (13). Além disso, participa na ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), em processos neoplásicos (72), e estimula a angiogênese, através da indução do aumento da proliferação de células endoteliais no ambiente tumoral (73-76).

A carcinogênese envolve vários mecanismos, desde sua iniciação, promoção e progressão. Uma das importantes vias de desenvolvimento do câncer é a via de transdução de sinal Janus kinase (JAK) ativador da via de sinalização de transcrição (STAT), via (JAK/STAT). A leptina atua nesta via para promover algumas alterações celulares (77).

A leptina pode influenciar no processo proliferativo, através de mecanismos diversos de transdução de sinal, induzindo, assim, sinais celulares para a ativação de vias indutoras de proliferação, sobrevivência e migração de células neoplásicas (78) (Figura 3).

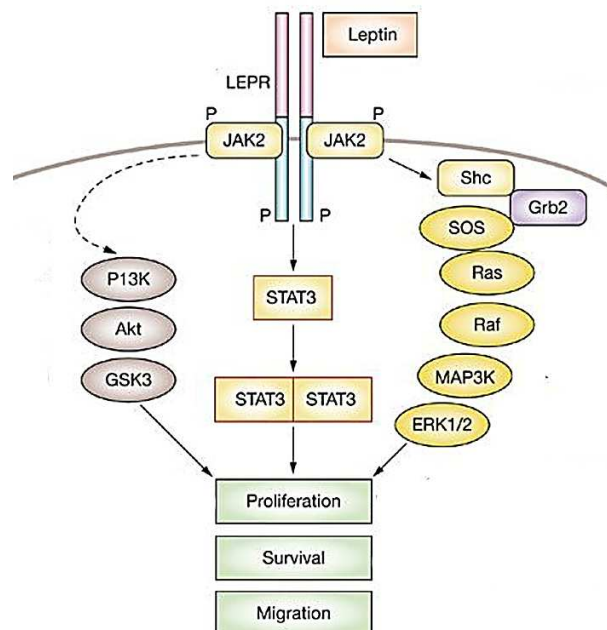


Figura 3. Leptina promove proliferação, migração e sobrevivência pela via STAT3, PI3K, ERK1 e ERK2.

Fonte: Adaptada de SCHAFFLER, 2007

Evidências mostraram que a leptina atua no processo migratório (79), na invasão tumoral, mecanismos estes favorecidos pelo aumento da expressão de MMP-2 (80). Além disso, exerce um efeito citoprotetor, modulando a via fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3-K) (81), e aumentando a expressão de VEGF, como consequência tem-se o aumento da angiogênese tumoral (82). Em células neoplásicas, a expressão aumentada de leptina ativando as vias de transdução, como MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT e NFkB, desencadeia mecanismos celulares e moleculares levando a um fenótipo neoplásico mais agressivo (Figura 4). Sabe-se que o NFkB é ativado pela sinalização de leptina e que pode aumentar a sobrevivência de células neoplásicas em tratamento quimioterapêutico (83).

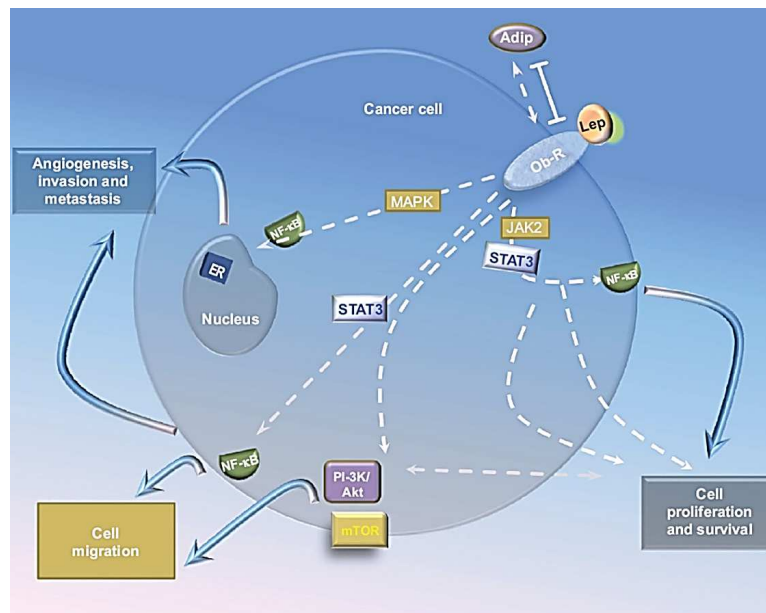


Figura 4. Ligação da leptina com receptor LepR, atuação em NFkB, proliferação, migração e angiogênese.

Fonte: Adaptada de CANDELARIA, 2017

Um estudo realizado com abordagem voltada ao uso de quimioterápicos em concomitância com a utilização de nanopartículas, carregando o antagonista da leptina, as células diminuíram significativamente os níveis de pSTAT3 induzidos pela leptina em linhagem de câncer de mama. Mostrou uma diminuição dos níveis de ciclina D1 e reduziu a progressão da fase S induzida pela leptina (84).

### 3.3 Sistema ubiquina-proteassomo e carcinogênese de boca

A ubiquitina é um polipeptídeo de 76 aminoácidos. A conjugação covalente da ubiquitina a substratos específicos atua em uma vasta variedade de processos biológicos, que vão desde a proteólise até ao dano do DNA. Sua principal função é marcar proteínas para a degradação. As proteínas são degradadas de forma seletiva em células eucarióticas. A degradação mediada por ubiquitina de proteínas reguladoras desempenha papéis importantes no controle de numerosos processos, incluindo a progressão do ciclo celular, transdução de sinal, regulação transcricional, redução de receptor e endocitose, resposta imune. Anormalidades em processos mediados por ubiquitina demonstraram causar condições patológicas, incluindo a transformação maligna (85).

O proteassoma 26S é o principal complexo componente do sistema ubiquitina-proteassomo, responsável pela proteólise. Esse complexo é uma protease multicatalítica composta por dois complexos regulatórios 19S e por um complexo catalítico de ~700 kDa, designado por proteassoma 20S (86) (Figura 5).

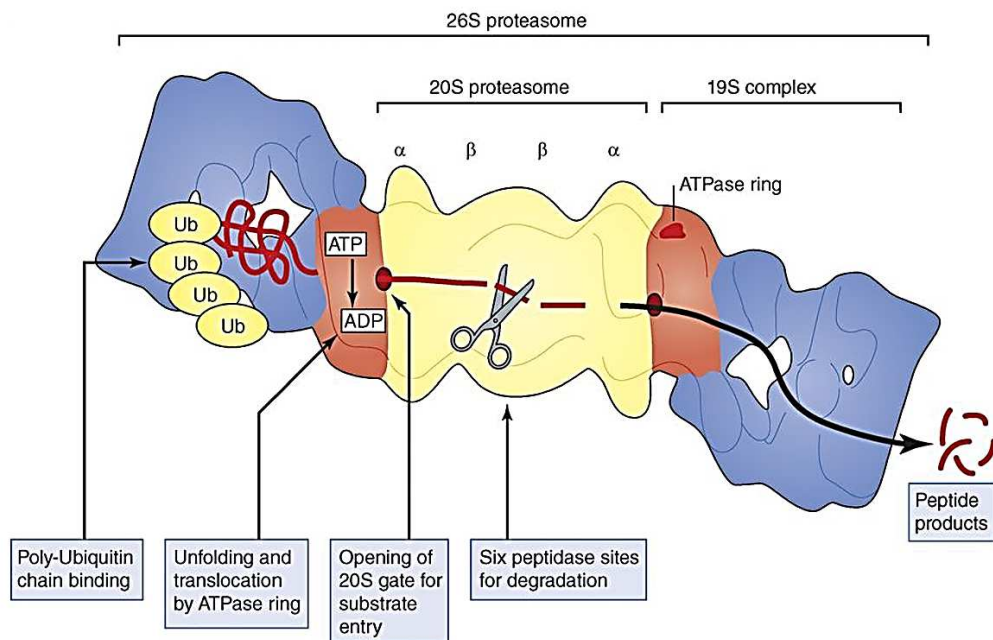


Figura 5. Complexo proteassoma complexo 26S e subunidades 20S e 19S  
 Fonte: Adaptada de GOLDBERG, 2012

A regulação da estabilidade protéica dependente de ubiquitinação afeta mecanismos fisiológicos diversos, incluindo senescência e progressão do ciclo celular, diferenciação celular, apoptose e transformação neoplásica (87).

A ubiquitinação protéica é um processo reversível, e as enzimas desubiquitinantes (DUBs) são proteases de cisteína, que clivam especificamente Ub de substratos de proteína Ub-conjugados. Apesar do grande número de DUBs já identificadas, pouco se sabe sobre os seus papéis fisiológicos ou substratos. As DUBs podem "editar" motivos de ubiquitina na cadeia de proteínas erroneamente ubiquitinadas ou gerar ubiquitina livre de cadeias de poliubiquitina libertadas após atividade proteassômica (88). A ação pré-proteassômica dos DUBs resulta na clivagem da etiqueta de poliubiquitina a partir de substratos específicos, evitando assim a sua degradação (88).

Estudos na literatura apontaram um importante envolvimento do sistema Ub-proteassoma nos eventos carcinogênese em diversos tipos de neoplasias. Na carcinogênese de boca, no entanto, há uma escassez de estudos sobre a real importância do sistema UB-proteassoma; além disso, não há um conhecimento preciso sobre a importância desse sistema na patogenia da doença.

A USP2a, uma desubiquitinase reconhecida pelo seu papel oncogênico, apresentou maior expressão no CEB, comparado com o tecido epitélio de mucosa clinicamente inalterado, além de ter sido associada com a presença de metástase locorregional (11). A USP2 pode interagir com fatores oncogênicos FASN, promovendo sua estabilização, e proteção contra a apoptose de células neoplásicas (89).

A ubiquitina E3 ligase SIAH2 foi apontada com um fator oncogênico superexpresso no CEB. A proteína SIAH2 está implicada em uma variedade de processos celulares, incluindo resposta à hipóxia, sobrevivência e biogênese mitocondrial. Níveis de mRNA SIAH2 foram significativamente aumentados em espécimes de CEB e em células cultivadas in vitro. Knockdown de SIAH2 levou à supressão do crescimento e indução de apoptose em um mecanismo independente de p53 (89).

PA28y é um membro da família de proteínas PA28, que atua especificamente sobre o proteassoma 20S, estimulando a hidrólise de peptídeos (90). Tal proteína foi identificada como um gene promotor da carcinogênese oral. Sua expressão aumentada foi associada a

formas mais agressivas de carcinoma oral, e foi negativamente associada com a sobrevivência de indivíduos acometidos pela doença (91).

Devido ao provável envolvimento do sistema UB-proteassomo na carcinogênese de boca, a investigação de proteínas componentes desse sistema, como potenciais alvos para estudos terapêuticos para o CEB tem despertado interesse científico. O cetuximab, por exemplo, é um anticorpo monoclonal quimérico que se liga ao domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), inibindo o crescimento tumoral, invasão, angiogênese e metástase. Em linhagens celulares de CEB, foi demonstrado que este quimioterápico apresenta um novo mecanismo de modulação da expressão de EGFR através do sistema UB-proteassomo. Cetuximab inibiu a sinalização EGFR e suprimiu a proliferação celular, migração e invasão EGF-mediada em células de CEB de língua (92).

Alguns componentes do sistema ubiquitina-proteassomo estão envolvidos na degradação proteolítica e estabilização de ciclina D1. A Usp2 possui essa função de estabilizar ciclina D1 e comprometendo sua degradação. Com isso, ocorre a super-expressão dessa proteína, favorecendo a progressão do ciclo celular com encurtamento da fase G1/S. Foi demonstrado que o processo de parada do ciclo pode ocorrer através pela inibição de USP2, atuando via ciclina D1 (93). Tal mecanismo encontra-se apresentado na Figura 6. A ciclina D1 (*CCND1*) é amplamente estudada no câncer, cuja expressão é, geralmente, super-regulada na doença (94).

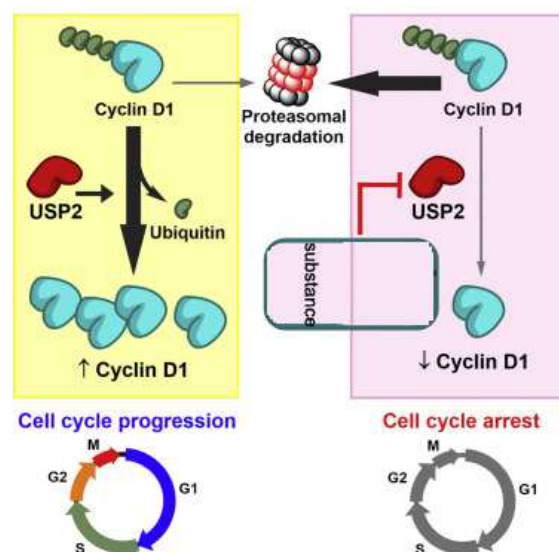


Figura 6. Usp2 modula degradação de ciclina D1, que atua na via de progressão e parada do ciclo celular.

Fonte Adaptada de MAGIERA, 2017

### 3.4. Radiação ionizante como estratégia terapêutica para o carcinoma epidermoide de boca

A radiação ionizante ou radioterapia (RT) é uma modalidade terapêutica para o tratamento do câncer e tem desempenhado um papel importante no controle do crescimento neoplásico em muitos pacientes com essa enfermidade, especialmente quando o indivíduo acometido pela doença não apresenta condições clínicas para ser submetido à cirurgia, ou não aceita as possíveis mutilações faciais que a intervenção cirúrgica pode acarretar (92).

Essa modalidade terapêutica é atualmente o tratamento adjuvante padrão para o CEB. Os pacientes com CEB avançado necessitam de RT adjuvante, sendo ela pré ou pós-operatória (95), sabendo-se que a RT pré-operatória aumenta o risco de complicações na cirurgia. A RT pré-operatória foi apresentada como uma estratégia que não traz vantagens consideráveis para a sobrevida do paciente, além de dificultar a realização da cirurgia em um intervalo menor do que seis semanas após o término da RT (95).

Os avanços técnicos conquistados na RT têm reduzido os efeitos colaterais agudos e crônicos relacionados à terapia, especialmente em pacientes submetidos à RT para câncer de cabeça e pescoço, dentre os quais destaca-se o CEB (96).

A ação da radioterapia pode ser através do dano no DNA e pela formação de espécies reativas de oxigênio. Com o dano ao DNA, os mecanismos de reparo desencadeiam ação sobre vários genes, conforme apresentado na Figura 7.



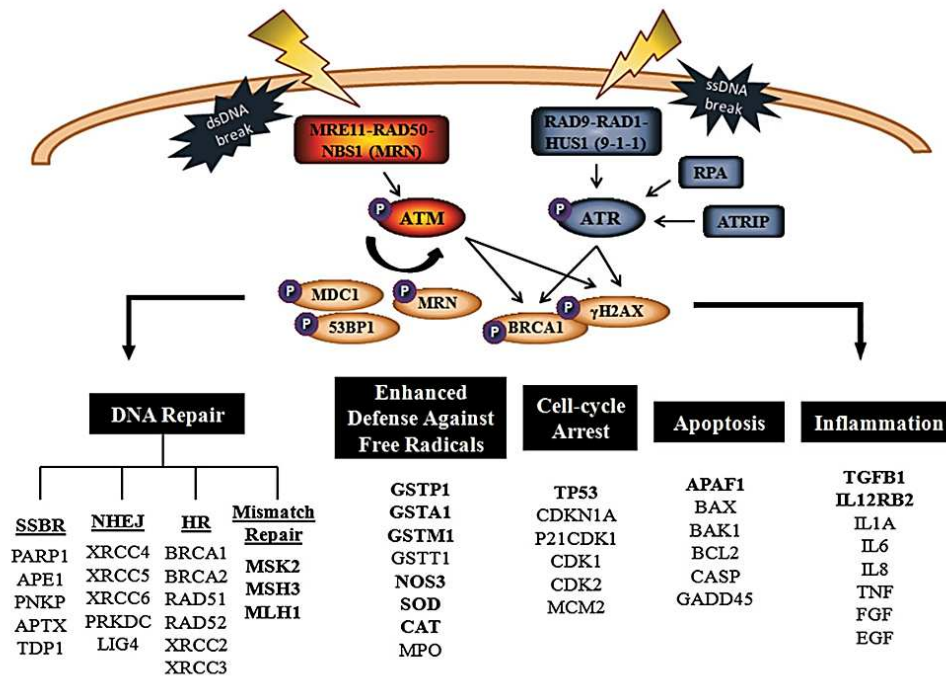


Figura 7. Mecanismo de atuação da radioterapia.

Fonte Adaptado de HUANG, 2017

Um gene muito relevante nesse processo trata-se do Ataxia telangiectasia mutado (ATM), que codifica uma proteína cinase, responsável pela detecção de rupturas de dupla cadeia de DNA e a iniciação no reparo e apoptose. Além da radiação ionizante terapêutica atuar sobre células neoplásicas, promovendo a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio para a indução da citotoxicidade e morte celular (97).

Apesar dos avanços obtidos nesta modalidade de tratamento, os tumores podem recorrer dentro do campo irradiado devido à baixa responsividade do organismo à terapia, levando a um mau prognóstico (98). Assim, é de fundamental importância a realização de pesquisas buscando um maior entendimento sobre os fatores que interferem sobre a sensibilidade de células neoplásicas à radiação ionizante terapêutica (99).

Não há um conhecimento preciso sobre a influência molecular da leptina sobre o tratamento de neoplasias, seja por quimio ou radioterapia. Um estudo demonstrou que a leptina pode estimular a proliferação de células de mieloma, reduzindo o efeito antitumoral da quimioterapia, através da ativação da sinalização AKT e STAT3 (100). No que se refere à radioterapia, o papel da leptina não foi ainda investigado, especialmente em células de CEB.

Sendo assim, esse foco de estudo representa uma abordagem interessante para um maior entendimento sobre os eventos moleculares que comprometem a resposta terapêutica ao tratamento de indivíduos acometidos pela doença.

## 4 PRODUTOS

4.1 Produto 1: Artigo *Leptin impairs the therapeutic effect of ionizing radiation in oral squamous cell carcinoma cells*, enviado para publicação no periódico: Gene - Journal - Elsevier

4.2 Produto 2: *Leptin modulates expression of ubiquitin-proteasome system components in oral squamous cell carcinoma cells: a preliminary study.*

#### 4.1 PRODUTO 1

O artigo 1, intitulado “: Leptin impairs the therapeutic effect of ionizing radiation in oral squamous cell carcinoma cells” submetido para publicação do periódico: Gene - Journal - Elsevier. Este artigo está apresentado a seguir.

**Leptin impairs the therapeutic effect of ionizing radiation in oral squamous cell carcinoma cells**

Rogério Gonçalves da Rocha<sup>1</sup>

Eliane Macedo Sobrinho Santos<sup>1,2</sup>

Eloá Mangabeira Santos<sup>1</sup>

Emisael Stênio Batista Gomes<sup>1</sup>

Guilherme Ramos Veloso<sup>3</sup>

Karina Marini de Aguiar<sup>1</sup>

Bruno Rodrigues Gonçalves<sup>4</sup>

Sérgio Henrique Souza Santos<sup>5</sup>

Alfredo Maurício Batista de Paula<sup>1,3</sup>

André Luiz Sena Guimarães<sup>1,3#</sup>

Lucyana Conceição Farias<sup>1,3#</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Health Science, Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Campus Araçuaí, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup>Oncology Center, Hospital Dilson Godinho, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

<sup>5</sup>Institute of Agricultural Sciences, Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

# These authors have contributed equally to this work.

\*Corresponding author:

Lucyana Conceição Farias  
Universidade Estadual de Montes Claros  
Hospital Universitário Clemente de Faria  
Laboratório de Pesquisa em Saúde  
Avenida Cula Mangabeira, 562  
Montes Claros, Minas Gerais, Brasil  
Zip code: 39401-001  
Phone: +55 38 32248327  
E-mail: lucyanacfarias@gmail.com

### Abstract

Leptin, an important hormone controlling energy homeostasis, has been linked to the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). Evidence indicates that head and neck cancer patients undergoing radiotherapy shows decreased leptin levels after radiotherapy treatment. Thus, we investigated, through phenotypic and molecular analyses, whether leptin can compromise the therapeutic effect of ionizing radiation and neoplastic behavior of OSCC cells. The human OSCC-derived cell lines SCC9 and SCC4 were treated with human recombinant leptin and exposed to 6Gy of irradiation. We performed the *in vitro* assays of cell migration, death, proliferation, and colony-forming ability. The reactive oxygen species (ROS) levels and proteome analysis by mass spectrometry were also conducted. Leptin was able to increase cell proliferation, migration, and colony-forming ability, despite the suppressive effect induced by irradiation. Furthermore, the leptin promoted a significant reduction of ROS intracellular accumulation, and increased the expression of the cancer-related proteins, as ACTC1, KRT6A, and EEF2 in irradiated OSCC cells. Our findings suggest that leptin impairs responsiveness of OSCC cells to the ionizing radiation, reducing the suppressive effects of irradiation on the neoplastic phenotype, and increasing protein expression important to carcinogenesis.

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma, Leptin, Ionizing radiation, Reactive Oxygen Species, ACTC1, KRT6A, EEF2.

## Introduction

Leptin is a key hormone regulator of energy balance and body weight control, whose biological functions are mediated through the binding to its receptor LepR, activating signal transduction pathways, as JAK/STAT, PI3K, and MAPK (Bjorbaek et al., 1997; Yamashita et al., 1998)

In addition to energy regulation, the leptin signaling plays important roles in several cellular functions, promoting cell proliferation, angiogenesis, and cell anchorage, as well as anti-apoptotic and pro-inflammatory effects (Sierra-Honigmann et al., 1998; Wauters et al., 2000; Barone et al., 2012). So, the aberrant activation of this signaling pathway can favor molecular changes related to carcinogenesis (Garofalo and Surmacz, 2006; Zou et al., 2016).

Leptin is associated with development and progression of several cancer types, as breast, prostate, and lung, interfering on neoplastic phenotype, and expression of cancer-related genes (Noda et al., 2015; Mishra et al., 2017; Tong et al., 2017). The leptin treatment of human cancer cells led to increase in cell proliferation, migration, and invasion; furthermore, it induced epithelial-to-mesenchymal transition, indicating the more aggressive phenotype (Mishra et al., 2017). This hormone also enhanced neoplastic behavior and regulated the expression of cell cycle-related proteins, increasing cyclin D1 expression, and reducing the expression of p21 protein (Noda et al., 2015).

In oral carcinogenesis, the leptin signaling has aroused the interest of researchers due to possible involvement in disease pathogenesis (Gharote and Mody, 2010; Domingos et al., 2014; Kaur and Jacobs, 2016). A study demonstrated through *in vitro* and *in vivo* assays, that leptin increased the rates of cell proliferation and migration and reduced apoptosis. Accordingly, leptin-treated oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells showed high mRNA expression of genes related to the proliferation, migration, and angiogenesis (Sobrinho Santos et al., 2017).

Based on this knowledge, some studies investigated whether leptin levels can be changed by oncological treatment, showing conflicting results (Argiris et al., 2011; Bain et al., 2014; Coskun et al., 2016). For example, the surgery associated with adjuvant chemotherapy and radiotherapy did not modify levels of leptin, following treatment in breast cancer patients (Coskun et al., 2016). The leptin expression in gastro-oesophageal adenocarcinomas was related to the resistance to cytotoxic chemotherapy, showing increased expression in nonresponding patients to the therapy (Bain et al., 2014).

The head and neck cancer patients undergoing radiotherapy shows decreased leptin levels by radiotherapy (Ozsoy et al., 2015). However, is not well understood whether the increased leptin levels are able to interfere with the effect of cancer treatment in OSCC. Thus, through phenotypic and molecular assays, we tested the hypothesis that leptin can compromise the therapeutic effect of ionizing radiation and neoplastic behavior of OSCC cells.



## Materials and methods

### *Cell Culture, Leptin treatment, and Irradiation*

The human OSCC cell lines SCC-9 and SCC-4 (CRL-1629 and CRL1624, ATCC Cell bank, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham's F-12 Nutrient Mix (DMEM-F12) (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics and 0.4 µg/ml hydrocortisone (Gibco, South America), and maintained at 37°C in a humidified atmosphere 5% CO<sub>2</sub>.

To *in vitro* assays, OSCC cells were treated with 100 ng/mL of recombinant human leptin (Invitrogen, USA), for 72 hours, as described previously (Sobrinho Santos et al., 2017). Next, the cells were irradiated at 6 Gy of single-dose cobalt-60 irradiation at a dose rate of 0.5 Gy/min, using a Telecobalt Machine Theratron Phoenix Philips SR 7510 (Eindhoven, Holanda). After 72 hours, the phenotype and molecular analyses were performed (Khafif et al., 2009). Tests were done in triplicate and at least three independent times. The cells were categorized into 4 groups: control group, ionizing radiation alone (IR), leptin-treated group (Lep), and leptin plus irradiation group (Lep\_IR)

### *Cell proliferation assay*

A density of  $1 \times 10^5$  OSCC cells was plated in 6-well plates and submitted to the experimental treatments with leptin and radiation exposure. After treatments, cell counting was measured through trypan-blue exclusion.

### *Migration assay*

The OSCC cells were plated at density of  $8 \times 10^4$  in 12-well plates and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, for 24 hours. After, cells were treated with leptin for 72 hours. Before radiation exposure, the cells were scraped with 200µl tip, creating a cell-free area to analyze migrating cells (Liang et al., 2007). Then, cells were irradiated and wound covered area by migrating cells was quantified using ImageJ software (NIH; Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij/>) (Schneider et al., 2012). The Olympus IX81 inverted microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA) coupled to camera SC30 (Olympus, Center Valley, PA, USA) was used to image capturing.

### *Cell Dead/viability assay*

In order, to analyze the dead cell/viable cell ratio, groups were stained with solution contained Acridine Orange 100 µg/ml (AO, Sigma, St. Louis, MO, USA) and Ethidium Bromide Stock (EB, Sigma, St. Louis, MO, USA). The intense EB staining (Ex360-370, Em420-460, DM400 filter) indicates cell death, while intense AO (Ex460-495, Em510-550, DM505 filter) indicates live cells. The FSX100 microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA) was used to image analysis.

### *Clonogenic assay*

The OSCC cells were seeded in 6-well plates and exposure to the experimental treatments. After irradiation, the cells were kept in a greenhouse for 72 hours. Then, cells were trypsinized and plated again in 6-well plates at a density of  $5 \times 10^2$  cells. It was maintained in growth medium for 10 days to forming colonies. Following this, colonies (cluster containing  $\geq 50$  cells) were fixed with 70% ethanol, stained with 2% Giemsa and quantified by ImageJ software (NIH; Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij/>). The non-irradiated control was used to normalization of surviving fraction of experimental groups (Franken et al., 2006).

### *Reactive oxygen species Assay*

The OSCC cells were incubated with 10 µM of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA, Sigma-Aldrich, USA) for 30 min at 37°C, washed twice with PBS buffer, and immediately photographed under a fluorescent microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA), and quantified using the ImageJ software. Cells treated with 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 2% fetal bovine serum was used as reaction internal control to the formation of reactive oxygen species (ROS) (Park, 2013).

### *Sample preparation and Mass spectrometry analysis*

Following leptin treatment and radiation exposure, cells were resuspended in 500 µl of extraction buffer containing protease inhibitors and urea and incubated at room temperature for 30 min. Protein extract were denatured in 1.6 M urea (Sigma, Germany) followed by reduction with dithiothreitol (Sigma, USA) at 5 mM for 25 minutes at 56°C, alkylation with iodoacetamide (Fluka, USA) at 14 mM for 30 minutes at room temperature protected from light and digestion with trypsin (Promega, USA) for 16 hours at 37 (ratio enzyme: substrate, 1:50). The reaction was stopped with 0.4% formic acid (Merck, USA) and, after desalination

using SepPack. The samples were dried samples and stored at -20°C for subsequent analysis in a Q-ToF Premier mass spectrometer.

Protein analysis was performed as the previously described method with appropriate modifications (Aragao et al., 2012). For data analysis, the spectra were acquired using software MassLynx v.4.1 and the raw data files were converted to a peak list format (mgf) without summing the scans by the software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.) and searched against the UniProt database, using Mascot engine v.2.3.01 (Matrix Science Ltd.). The normalized spectral counts were analyzed in Scaffold software (Proteome Software, Inc., Portland, OR, USA), adopting a protein threshold at over 95% probability to assesses the differentially expressed proteins between groups.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using SPSS 18.0 software and GraphPad Prism software (Version 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For the normality test, the Shapiro-Wilk test was adopted to verify distribution samples. ANOVA test with post hoc Tukey's multiple comparisons test was used to analyze phenotypic and molecular assays. The probability values <0.05 were considered statistically significant. For the proteome analysis, the differentially expressed proteins between groups were defined by the fold-change ratio greater than 1.5 and p-value <0.05, according to T-test.

## Results

*Leptin reduced the suppressive effects of irradiation on the neoplastic phenotype of OSCC cells.*

To assess whether leptin interferes on ionizing radiation (IR) effect in OSCC cells, we performed the phenotypic assays of cell migration, death, and proliferation. Leptin was able to increase cell proliferation, despite the suppressive effect induced by irradiation. Similar phenotypic behavior was observed in both OSCC cell lines (Fig 1A and Supplementary Fig 1A). Furthermore, we identified that leptin reduced IR-induced cell death (Figure 1B and Supplementary Fig 1B).

The radiation effect on cell migration was also reversed by leptin. While IR group showed lower migration percentage, the leptin treatment enhances migration ability of OSCC cells exposed to the radiation (Fig 1C).

*Leptin affected the sensitivity of OSCC cells to ionizing radiation, reducing the colony-forming ability*

To test the leptin effect on response/sensitivity of OSCC cells to radiation, we analyzed clonogenic formation. The cells treated with leptin showed low sensitivity to radiation, forming more cell clones than IR group (Fig. 1D).

*Leptin inhibited radiation-induced ROS generation*

The exposure of OSCC cells to IR led to increased production of intracellular ROS. Instead, the leptin promoted the significant reduction of ROS accumulation in irradiated cells (Fig. 2).

*Leptin increased expression of cancer-related proteins in OSCC cells irradiated*

We carried out an MS-based proteomic analysis to identify whether leptin modifies proteins expression in irradiated OSCC cells. In total, 61 proteins were detected (Supplementary Table 1), of which only 3 proteins were differentially expressed between groups, according to the fold change ratio greater than 1.5. Leptin increased expression of ACTC1, KRT6A, and EEF2 proteins in irradiated cells (Fig. 3). No protein showed significantly reduced expression between groups.

## Discussion

The adjuvant radiotherapy to the surgery is an important treatment modality for advanced squamous cell carcinoma in head and neck region. However, a poor response to radiotherapy remains a fundamental barrier to prognosis (Song et al., 2015). So, the research of factors impairing sensitivity of neoplastic cells to ionizing radiation is extremely relevant to better define therapeutic strategy, to improve tumor remission and disease control (Yu et al., 2016a).

The changes in expression of proteins related to the cell cycle, apoptosis, angiogenesis, and cell metabolism were shown to affect radiosensitivity of OSCC and HNSCC patients (Silva et al., 2008; Blatt et al., 2016; Gupta et al., 2016). For example, overexpression of Cyclin D1, EGFR and p53 were associated with resistance to chemoradiation, the risk of locoregional recurrence and metastasis in OSCC patients (Gupta et al., 2016).

The leptin signaling pathway has emerged as an interesting target involved in development and progression of oral carcinogenesis (Sobrinho Santos et al., 2017), but is not well known whether increased levels of this hormone can interfere with the effect of cancer treatment in OSCC. In this study, we found that leptin compromised the effect of ionizing radiation on the neoplastic behavior of OSCC cells. Despite the suppressive effect of irradiation, leptin enhances proliferative phenotype and migration ability of OSCC cells exposed to the radiation. There is no precise knowledge about the molecular influence of leptin on cancer treatment, whether by radio- or chemotherapy. In a similar study to our own, it was demonstrated that leptin can stimulate myeloma proliferation, reducing the antitumor effect of chemotherapy, by activating AKT and STAT3 pathways (Yu et al., 2016b)

The therapeutic ionizing radiation acts on neoplastic cell inducing cell death by ROS generation (Shimura et al., 2017). Furthermore, it reduces the cell survival, controlling tumor growth (Li et al., 2017). The radiation-induced high level of ROS promotes oxidative stress, and destabilization of cell integrity and metabolism of cancer cells, sensitizing them to undergo apoptosis (Dayal et al., 2014). Our results revealed that leptin decreased IR-induced cell death, accordingly with inhibition of ROS levels in irradiated cells. The leptin also led to the higher cell survival rates, evidenced by maintaining of cell multiplication and increase in the clonogenic formation after exposure to the radiation. A study identified that leptin can improve the bioenergetic efficiency of cancer cells, avoiding the ROS production and promoting favoring cell growth and survival (Blanquer-Rossello et al., 2015).

Given the results found in this study, which the leptin impaired responsiveness of OSCC cells to the ionizing radiation, we think to be reasonable to investigate whether leptin alters

proteins expression in irradiated OSCC cells. Through MS-based proteomic analysis, we identified that the leptin promotes increase of the expression of cancer-related proteins ACTC1, KRT6A, and EEF2.

The alpha cardiac muscle actin 1 (ACTC1), a cytoskeletal protein linked to cell motility, was associated with tumoral invasion (Ohtaki et al., 2017), and to the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in cancer (Lopez et al., 2012). The up-regulation of EMT genes, including ACTC1, can favor high cell survival and radioresistance of cervical cancer cells (Lopez et al., 2012). Similarly, the down-regulation of ACTC expression was identified in radiosensitive cells of HNSCC, after radiation treatment (Strozynski et al., 2015).

The KRT6 or keratin 6A, type II member of the cytokeratin family, was shown as a potential biomarker to discriminate normal mucosa from OSCC (Thiel et al., 2011). However, its molecular role in pathways related to the therapeutic sensitivity was not investigated in oral cancer. We identified that leptin favored the KRT6A overexpression in OSCC cells exposed to ionizing radiation, while the control group showed lower expression levels.

The high activity of protein synthesis is one of the hallmarks of cancer cell metabolism (Grzmil and Hemmings, 2012). In this pathway, the eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2), an important factor for the polypeptide chain elongation step, is overexpressed in several cancer types and plays an oncogenic function in neoplastic cell growth (Oji et al., 2014; Zhang et al., 2017). The EEF2 overexpression was linked to progression of G2/M of the cell cycle, leading to the cancer cell growth (Nakamura et al., 2009). Furthermore, its expression levels were significantly higher in colorectal, gastric cancer and in HNSCC than healthy individuals (Oji et al., 2014). Little is known about the influence of this protein on radiation sensitivity of cancer cells. Our results revealed the leptin favoring an increase in EEF2 expression in OSCC cells under therapeutic radiation, accordingly with higher cell proliferation rates. Evidence indicates that EEF2 regulates activities of Akt, an import factor implicated in cell cycle progression (Nakamura et al., 2009). Additionally, it was demonstrated that AKT is involved in the response to radiation (Sahlberg et al., 2014). The activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promoted radioresistance of OSCC (Yu et al., 2017). So, this prompted us to think that leptin can reduce the sensitivity of OSCC cells to radiation, increasing the cell proliferation, through upregulation EEF2 protein.

Taken together our findings points the leptin as an important factor impairing the responsivity of OSCC cells to the ionizing radiation, reducing its suppressive effects on the neoplastic phenotype, and increasing protein expression of important genes involved in carcinogenesis pathway. We highlight the need for more functional studies to better

understanding the real importance of leptin in molecular events related to radiation effects in oral cancer.

## **Compliance with Ethical Standards**

**Funding:** This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. Dr. Guimarães and Dr. De Paula are research fellows of the CNPq.

**Acknowledgments:** We thank the Laboratório Nacional de Biociências LNBio CNPEM-Brazil, in especial to technical assistance in mass spectrometry analysis given by Bianca A. Pauletti.

**Conflict of Interest:** All authors declare that no financial relationships exist regarding any of the products involved in this study.

**Ethical approval:** The study was approved by the local ethics committee of Universidade Estadual de Montes Claros/Brazil (Protocol number: CAAE: 35440514.2.0000.5146).

**Author contributions:** Conceived and designed the experiments: RGR, EMSS, ALSG, LCF. Performed the experiments: RGR, EMSS, EMS, ESBG, GRV, KMA. Analyzed the data: RGS, LCF, ALSG, EMSS. Contributed reagents/materials/analysis tools: AMBP, SHSS, ALSG, LCF, BRG. Wrote the manuscript: RGS, LCF, ALSG, EMSS.



## Figures List

**Fig. 1** Changes in neoplastic behavior of OSCC cells treated with leptin 100 ng/mL for 72 hours and exposed to 6 Gy single dose radiation (A) Proliferative behavior of SCC4 cell line. (B) Cell Dead/viability assay by colorimetry with acridine orange (AO) and ethidium bromide (EB). AO is able to penetrate into cells emitting green fluorescence. EB emits red fluorescence. (C) Cell migration assay. The graph and representative image of migrating cells. (D) Clonogenic assay. The cluster indicates the clonogenic formation of OSCC cells for the different treatments. Significance was determined using ANOVA One-way test; statistical significance:  $p < 0.05$ . The cells were categorized into 4 groups: control group, ionizing radiation alone (IR), leptin-treated group (Lep), and leptin plus irradiation group (Lep\_IR)

**Fig. 2** Reactive oxygen species Assay. Graph and representative microscopic images from the ROS generation evidenced by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate and observed in a fluorescence microscopy. Results are shown as a mean percentage of fluorescent hotspots of microscopic fields, considering fluorescent cells/cells total ratio. Significance was determined using ANOVA One-way test; statistical significance:  $p < 0.05$ . The cells were categorized into 4 groups: control group, ionizing radiation alone (IR), leptin-treated group (Lep), and leptin plus irradiation group (Lep\_IR)

**Fig.3** Heat map showing proteins analysis of differentially expressed proteins identified by mass spectrometry. The analysis considered the leptin-treated OSCC cells exposed to 6Gy of ionizing irradiation (Leptin\_IR group) and the control group of irradiated cells (Control\_IR). Red Color indicates the proteins with the highest relevance score. Green indicates a lower score. The significantly up-regulated proteins were defined according to the fold change ratio greater than 1.5, and  $p$ -value  $> 0.05$ . Leptin increased expression of ACTC1, KRT6A, and EEF2 proteins in irradiated OSCC cells.

## Supplementary Material

**Fig.1** Changes in neoplastic behavior of OSCC cells treated with leptin 100 ng/mL for 72 hours and exposed to 6 Gy single dose radiation (A) Proliferative behavior of SCC9 cells. (B) Cell Dead/viability assay by colorimetry with acridine orange (AO) and ethidium bromide (EB). AO is able to penetrate into cells emitting green fluorescence. EB emits red fluorescence. Significance was determined using ANOVA One-way test; statistical significance:  $p < 0.05$ . The cells were categorized into 4 groups: control group, ionizing radiation alone (IR), leptin-treated group (Lep), and leptin plus irradiation group (Lep\_IR)

**Table 1** List of differentially expressed proteins between leptin-treated OSCC cells exposed to 6Gy of ionizing irradiation and control group of irradiated cells.

## References

- Aragao, A.Z., Belloni, M., Simabuco, F.M., Zanetti, M.R., Yokoo, S., Domingues, R.R., Kawahara, R., Pauletti, B.A., Goncalves, A., Agostini, M., Graner, E., Coletta, R.D., Fox, J.W. and Paes Leme, A.F., 2012. Novel processed form of syndecan-1 shed from SCC-9 cells plays a role in cell migration. *PLoS One* 7, e43521.
- Argiris, A., Lee, S.C., Feinstein, T., Thomas, S., Branstetter, B.F.t., Seethala, R., Wang, L., Gooding, W., Grandis, J.R. and Ferris, R.L., 2011. Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. *Oral Oncol* 47, 961-6.
- Bain, G.H., Collie-Duguid, E., Murray, G.I., Gilbert, F.J., Denison, A., McKiddie, F., Ahearn, T., Fleming, I., Leeds, J., Phull, P., Park, K., Nanthakumaran, S., Grabsch, H.I., Tan, P., Welch, A., Schweiger, L., Dahle-Smith, A., Urquhart, G., Finegan, M., Matula, K.M. and Petty, R.D., 2014. Tumour expression of leptin is associated with chemotherapy resistance and therapy-independent prognosis in gastro-oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 110, 1525-34.
- Barone, I., Catalano, S., Gelsomino, L., Marsico, S., Giordano, C., Panza, S., Bonofiglio, D., Bossi, G., Covington, K.R., Fuqua, S.A. and Ando, S., 2012. Leptin mediates tumor-stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells. *Cancer Res* 72, 1416-27.
- Bjorbaek, C., Uotani, S., da Silva, B. and Flier, J.S., 1997. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272, 32686-95.
- Blanquer-Rossello, M.M., Santandreu, F.M., Oliver, J., Roca, P. and Valle, A., 2015. Leptin Modulates Mitochondrial Function, Dynamics and Biogenesis in MCF-7 Cells. *J Cell Biochem* 116, 2039-48.
- Blatt, S., Voelxen, N., Sagheb, K., Pabst, A.M., Walenta, S., Schroeder, T., Mueller-Klieser, W. and Ziebart, T., 2016. Lactate as a predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years. *Clin Oral Investig* 20, 2097-2104.
- Coskun, T., Kosova, F., Ari, Z., Sakarya, A. and Kaya, Y., 2016. Effect of oncological treatment on serum adipocytokine levels in patients with stage II-III breast cancer. *Mol Clin Oncol* 4, 893-897.
- Dayal, R., Singh, A., Pandey, A. and Mishra, K.P., 2014. Reactive oxygen species as mediator of tumor radiosensitivity. *J Cancer Res Ther* 10, 811-8.
- Domingos, P.L., Farias, L.C., Pereira, C.S., das Gracas Pena, G., Reis, T.C., Silva, R.R., Fraga, C.A., de Souza, M.G., Soares, M.B., Jones, K.M., Menezes, E.V., Nobre, S.A., Rodrigues Neto, J.F., de Paula, A.M., Velasquez-Melendez, J.G. and Sena Guimaraes, A.L., 2014. Leptin receptor polymorphism Gln223Arg (rs1137101) in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant oral lesions. *Springerplus* 3, 683.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1, 2315-9.
- Garofalo, C. and Surmacz, E., 2006. Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 207, 12-22.
- Gharote, H.P. and Mody, R.N., 2010. Estimation of serum leptin in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 39, 69-73.
- Grzmil, M. and Hemmings, B.A., 2012. Translation regulation as a therapeutic target in cancer. *Cancer Res* 72, 3891-900.
- Gupta, S., Kushwaha, V.S., Verma, S., Khan, H., Bhatt, M.L., Husain, N., Negi, M.P., Bhosale, V.V. and Ghatak, A., 2016. Understanding molecular markers in recurrent oral squamous cell carcinoma treated with chemoradiation. *Heliyon* 2, e00206.
- Kaur, J. and Jacobs, R., 2016. Salivary and serum leptin levels in patients with squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. *Clin Oral Investig* 20, 39-42.

- Khafif, A., Lev-Ari, S., Vexler, A., Barnea, I., Starr, A., Karaush, V., Haif, S. and Ben-Yosef, R., 2009. Curcumin: a potential radio-enhancer in head and neck cancer. *Laryngoscope* 119, 2019-26.
- Li, M.Y., Liu, J.Q., Chen, D.P., Li, Z.Y., Qi, B., He, L., Yu, Y., Yin, W.J., Wang, M.Y. and Lin, L., 2017. Radiotherapy induces cell cycle arrest and cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma via the ATM and Smad pathways. *Cancer Biol Ther*, 0.
- Liang, C.C., Park, A.Y. and Guan, J.L., 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2, 329-33.
- Lopez, J., Poitevin, A., Mendoza-Martinez, V., Perez-Plasencia, C. and Garcia-Carranca, A., 2012. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* 12, 48.
- Mishra, A.K., Parish, C.R., Wong, M.L., Licinio, J. and Blackburn, A.C., 2017. Leptin signals via TGF $\beta$ 1 to promote metastatic potential and stemness in breast cancer. *PLoS One* 12, e0178454.
- Nakamura, J., Aoyagi, S., Nanchi, I., Nakatsuka, S., Hirata, E., Shibata, S., Fukuda, M., Yamamoto, Y., Fukuda, I., Tatsumi, N., Ueda, T., Fujiki, F., Nomura, M., Nishida, S., Shirakata, T., Hosen, N., Tsuboi, A., Oka, Y., Nezu, R., Mori, M., Doki, Y., Aozasa, K., Sugiyama, H. and Oji, Y., 2009. Overexpression of eukaryotic elongation factor eEF2 in gastrointestinal cancers and its involvement in G2/M progression in the cell cycle. *Int J Oncol* 34, 1181-9.
- Noda, T., Kikugawa, T., Tanji, N., Miura, N., Asai, S., Higashiyama, S. and Yokoyama, M., 2015. Longterm exposure to leptin enhances the growth of prostate cancer cells. *Int J Oncol* 46, 1535-42.
- Ohtaki, S., Wanibuchi, M., Kataoka-Sasaki, Y., Sasaki, M., Oka, S., Noshiro, S., Akiyama, Y., Mikami, T., Mikuni, N., Kocsis, J.D. and Honmou, O., 2017. ACTC1 as an invasion and prognosis marker in glioma. *J Neurosurg* 126, 467-475.
- Oji, Y., Tatsumi, N., Fukuda, M., Nakatsuka, S., Aoyagi, S., Hirata, E., Nanchi, I., Fujiki, F., Nakajima, H., Yamamoto, Y., Shibata, S., Nakamura, M., Hasegawa, K., Takagi, S., Fukuda, I., Hoshikawa, T., Murakami, Y., Mori, M., Inoue, M., Naka, T., Tomonaga, T., Shimizu, Y., Nakagawa, M., Hasegawa, J., Nezu, R., Inohara, H., Izumoto, S., Nonomura, N., Yoshimine, T., Okumura, M., Morii, E., Maeda, H., Nishida, S., Hosen, N., Tsuboi, A., Oka, Y. and Sugiyama, H., 2014. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumorassociated antigen overexpressed in various types of cancers. *Int J Oncol* 44, 1461-9.
- Ozsoy, S., Besirli, A., Unal, D., Abdulrezzak, U. and Orhan, O., 2015. The association between depression, weight loss and leptin/ghrelin levels in male patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. *Gen Hosp Psychiatry* 37, 31-5.
- Park, W.H., 2013. The effect of MAPK inhibitors and ROS modulators on cell growth and death of H(2)O(2)-treated HeLa cells. *Mol Med Rep* 8, 557-64.
- Sahlberg, S.H., Gustafsson, A.S., Pendekanti, P.N., Glimelius, B. and Stenerlow, B., 2014. The influence of AKT isoforms on radiation sensitivity and DNA repair in colon cancer cell lines. *Tumour Biol* 35, 3525-34.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9, 671-675.
- Shimura, T., Sasatani, M., Kawai, H., Kamiya, K., Kobayashi, J., Komatsu, K. and Kunugita, N., 2017. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. *Cell Cycle* 16, 565-573.
- Sierra-Honigmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J. and

- Flores-Riveros, J.R., 1998. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281, 1683-6.
- Silva, P., Slevin, N.J., Sloan, P., Valentine, H., Cresswell, J., Ryder, D., Price, P., Homer, J.J. and West, C.M., 2008. Prognostic significance of tumor hypoxia inducible factor-1alpha expression for outcome after radiotherapy in oropharyngeal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72, 1551-9.
- Sobrinho Santos, E.M., Guimaraes, T.A., Santos, H.O., Cangussu, L.M.B., de Jesus, S.F., Fraga, C.A.C., Cardoso, C.M., Santos, S.H.S., de Paula, A.M.B., Gomez, R.S., Guimaraes, A.L.S. and Farias, L.C., 2017. Leptin acts on neoplastic behavior and expression levels of genes related to hypoxia, angiogenesis, and invasiveness in oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 39, 1010428317699130.
- Song, J.H., Jeong, B.K., Choi, H.S., Jeong, H., Kang, M.H., Kang, J.H., Kim, J.P., Park, J.J., Woo, S.H., Jang, H.S., Choi, B.O. and Kang, K.M., 2015. Comparison of Failure Patterns Between Conventional and Intensity-modulated Radiotherapy for Stage III and IV Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 35, 6833-40.
- Strozynski, J., Heim, J., Bunbanjerdasuk, S., Wiesmann, N., Zografidou, L., Becker, S.K., Meierl, A.M., Gouveris, H., Luddens, H., Grus, F. and Brieger, J., 2015. Proteomic identification of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as irradiation responsive protein related to migration. *J Proteomics* 113, 154-61.
- Thiel, U.J., Feltens, R., Adryan, B., Gieringer, R., Brochhausen, C., Schuon, R., Fillies, T., Grus, F., Mann, W.J. and Brieger, J., 2011. Analysis of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma by MALDI-TOF MS. *J Oral Pathol Med* 40, 369-79.
- Tong, X., Ma, Y., Zhou, Q., He, J., Peng, B., Liu, S., Yan, Z., Yang, X. and Fan, H., 2017. Serum and tissue leptin in lung cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* 8, 19699-19711.
- Wauters, M., Considine, R.V. and Van Gaal, L.F., 2000. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 143, 293-311.
- Yamashita, T., Murakami, T., Otani, S., Kuwajima, M. and Shima, K., 1998. Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 752-9.
- Yu, C.C., Huang, H.B., Hung, S.K., Liao, H.F., Lee, C.C., Lin, H.Y., Li, S.C., Ho, H.C., Hung, C.L. and Su, Y.C., 2016a. AZD2014 Radiosensitizes Oral Squamous Cell Carcinoma by Inhibiting AKT/mTOR Axis and Inducing G1/G2/M Cell Cycle Arrest. *PLoS One* 11, e0151942.
- Yu, C.C., Hung, S.K., Lin, H.Y., Chiou, W.Y., Lee, M.S., Liao, H.F., Huang, H.B., Ho, H.C. and Su, Y.C., 2017. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as an effectively radiosensitizing strategy for treating human oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncotarget* 8, 68641-68653.
- Yu, W., Cao, D.D., Li, Q.B., Mei, H.L., Hu, Y. and Guo, T., 2016b. Adipocytes secreted leptin is a pro-tumor factor for survival of multiple myeloma under chemotherapy. *Oncotarget* 7, 86075-86086.
- Zhang, X., Hu, L., Du, M., Wei, X., Zhang, J., Hui, Y., Chen, C., Li, G. and Hou, J., 2017. Eukaryotic Elongation Factor 2 (eEF2) is a Potential Biomarker of Prostate Cancer. *Pathol Oncol Res*.
- Zou, H., Liu, Y., Wei, D., Wang, T., Wang, K., Huang, S., Liu, L., Li, Y., Ge, J., Li, X., Zhu, H., Wang, L., Zhao, S., Zhang, X. and Wang, L., 2016. Leptin promotes proliferation and metastasis of human gallbladder cancer through OB-Rb leptin receptor. *Int J Oncol* 49, 197-206.

Figure 1

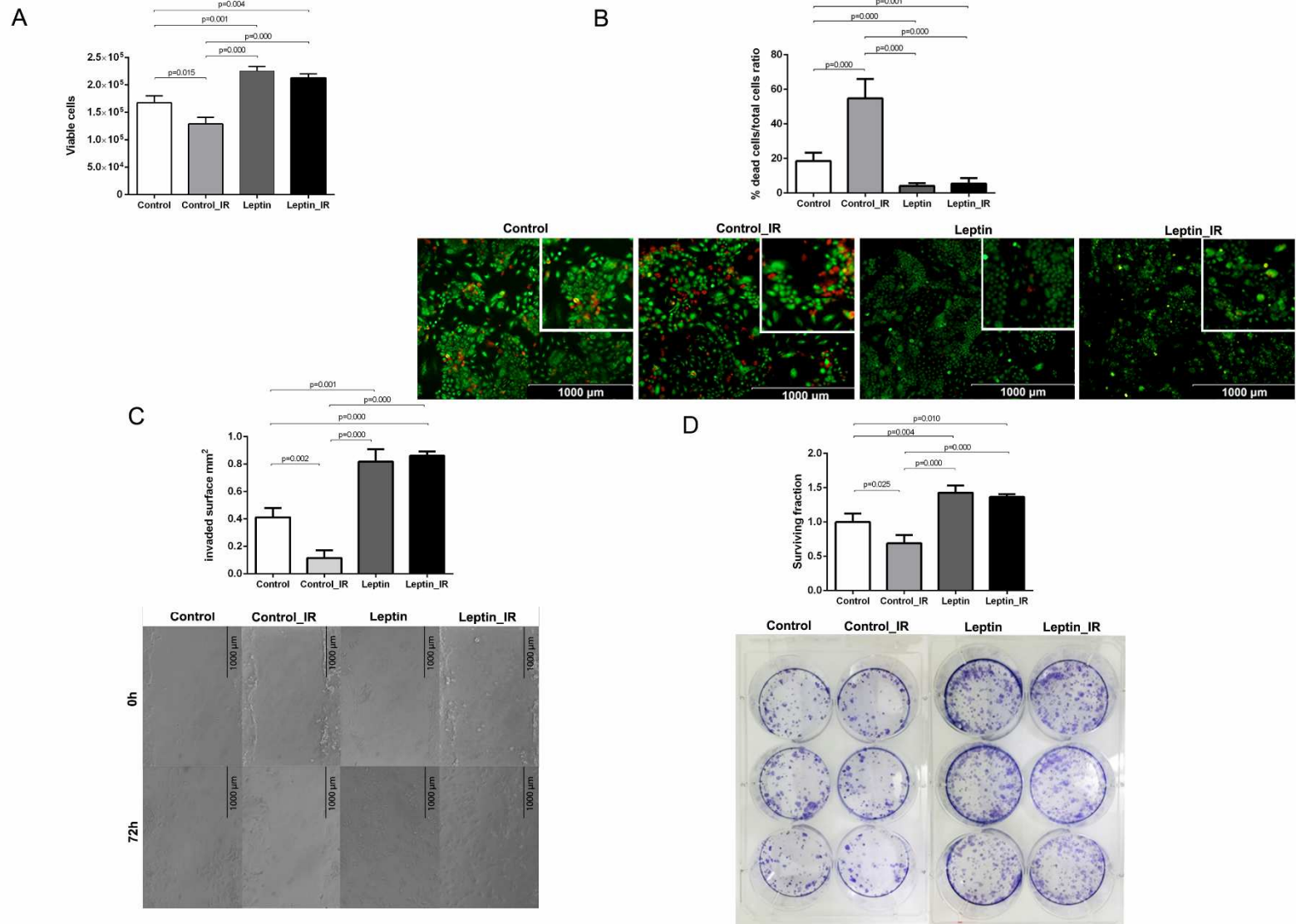


Figure 2

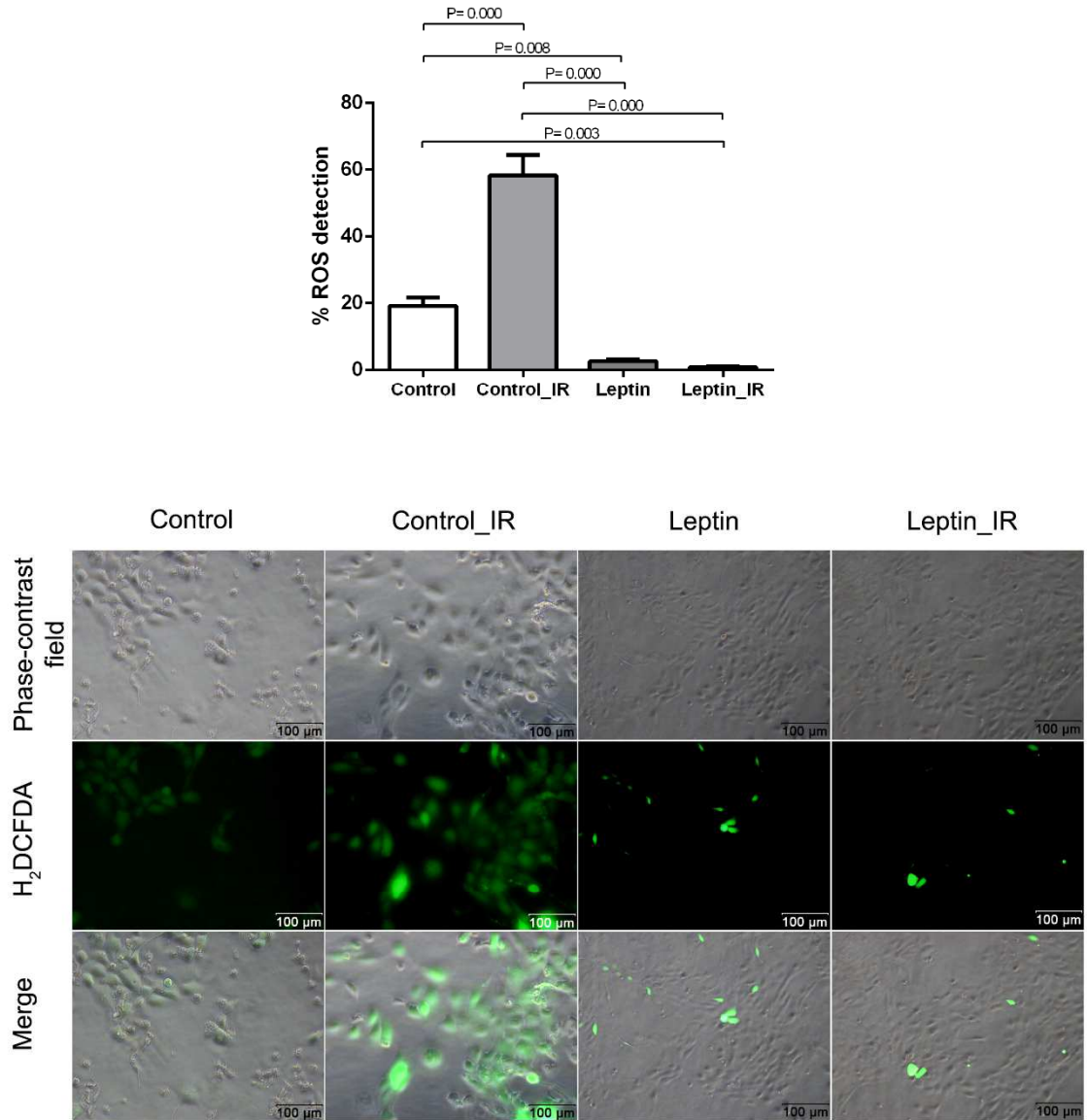
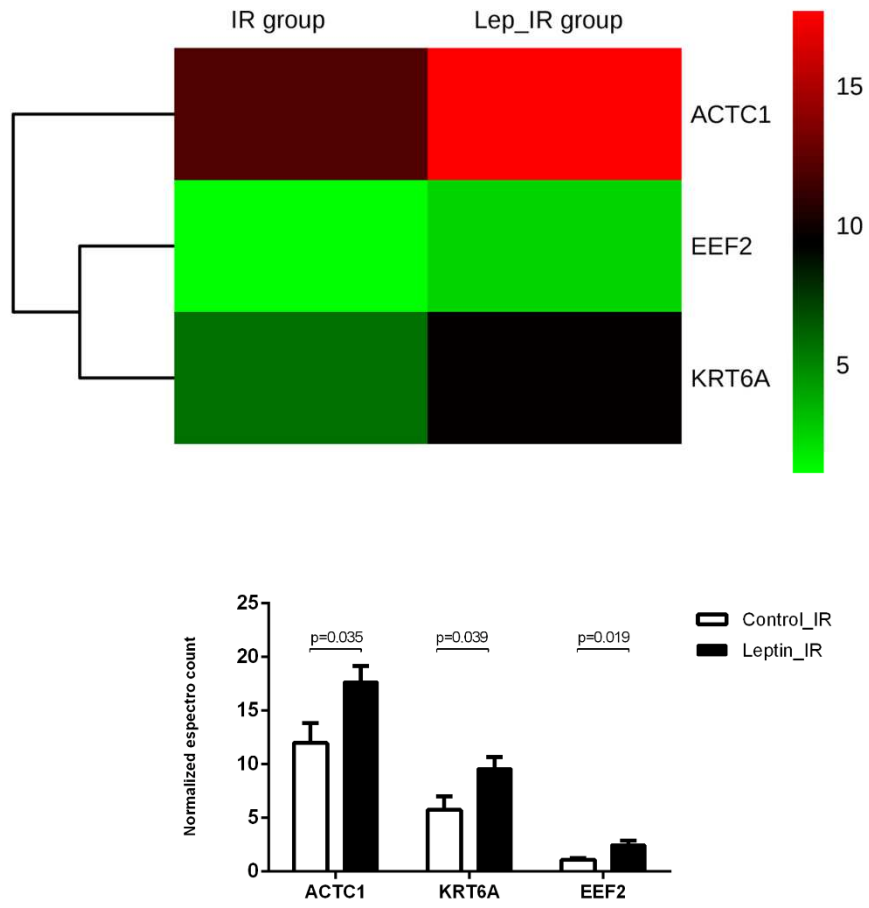


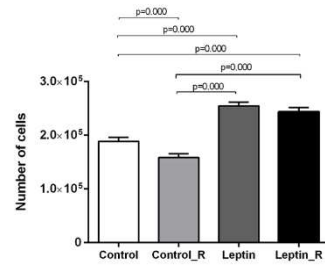
Figure 3



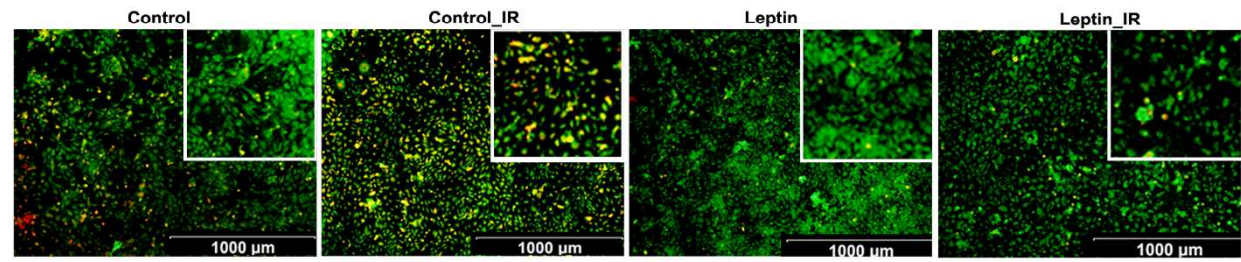
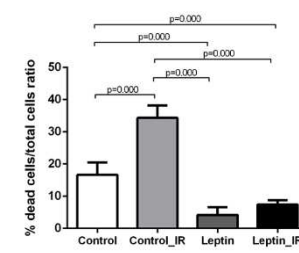


## Supplementary Figure 1

A



B



Supplementary Table 1

Protein Name	Symbol	Control 1	Control 2	Control 3	Leptin 1	Leptin 2	Leptin 3	Fold-change*	p-value
L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2	LDHA	2,0486	0,98512	0	0,9373	3,5591	2,8962	2,4	0,214
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Homo sapiens GN=UBA52 PE=1 SV=2	UBA52	1,0243	0,98512	0	1,8746	0,88978	1,9308	2,3	0,133
Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4	EEF2	1,0243	0,98512	1,2787	2,8119	1,7796	2,8962	<b>2,3</b>	<b>0,019*</b>
Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=2	TALDO1	1,0243	0,98512	0	0,9373	2,6694	0,96542	2,3	0,267
Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3	P4HB	2,0486	1,9702	2,5574	4,6865	2,6694	4,8271	1,9	0,061
Isoform of P06753, Tropomyosin alpha- 3 chain OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=1 SV=1	TMP3	1,0243	0,98512	1,2787	2,8119	1,7796	0,96542	1,7	0,235
Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3	KRT6A	7,1702	4,9256	5,1148	7,4984	10,677	10,62	<b>1,7</b>	<b>0,039*</b>
Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=1 SV=7	KRT8	1,0243	2,9554	1,2787	0,9373	5,3387	1,9308	1,6	0,539
Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=2	MYL6	1,0243	1,9702	2,5574	2,8119	1,7796	3,8617	1,5	0,266
Fascin OS=Homo sapiens GN=FSCN1 PE=1 SV=3	FSCN1	2,0486	0,98512	0	0	2,6694	1,9308	1,5	0,626
Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4	MYH9	1,0243	1,9702	3,8361	3,7492	2,6694	3,8617	1,5	0,275

Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1	ACTC1	13,316	9,8512	12,787	20,621	16,016	16,412	1,5	0,035*
Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	HIST1H4A	4,0973	5,9107	5,1148	6,5611	6,2285	7,7233	1,4	0,061
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	KRT5	6,1459	5,9107	3,8361	8,4357	7,1183	5,7925	1,3	0,161
Isoform of P04406, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=1	GAPDH	6,1459	8,8661	6,3935	10,31	11,567	6,7579	1,3	0,225
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=VDAC1 PE=1 SV=2	VDAC1	6,1459	0,98512	1,2787	3,7492	3,5591	3,8617	1,3	0,612
Cathepsin D OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1	CTSD	2,0486	0,98512	1,2787	1,8746	0,88978	2,8962	1,3	0,534
Protein S100-A11 OS=Homo sapiens GN=S100A11 PE=1 SV=2	S100A11	4,0973	1,9702	2,5574	2,8119	3,5591	4,8271	1,3	0,378
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPCL1 PE=2 SV=1	HNRNPCL1	2,0486	0,98512	1,2787	2,8119	1,7796	0,96542	1,3	0,541
ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3	ATP5B	4,0973	6,8958	2,5574	6,5611	6,2285	3,8617	1,2	0,536
Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	NPM1	3,0729	2,9554	2,5574	5,6238	2,6694	1,9308	1,2	0,657
Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	ENO1	8,1945	10,836	7,6722	12,185	9,7876	9,6542	1,2	0,269
Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	TUBA1B	12,292	14,777	7,6722	8,4357	18,685	13,516	1,2	0,616

Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	PRDX1	1,0243	2,9554	2,5574	1,8746	2,6694	2,8962	1,1	0,674
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	HSPA8	3,0729	7,881	3,8361	7,4984	4,4489	4,8271	1,1	0,728
Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=1	HSPA1A	6,1459	4,9256	2,5574	3,7492	5,3387	5,7925	1,1	0,750
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	EEF1A1	4,0973	8,8661	5,1148	6,5611	8,0081	4,8271	1,1	0,811
Talin-1 OS=Homo sapiens GN=TLN1 PE=1 SV=3	TLN1	9,2188	8,8661	12,787	10,31	9,7876	12,55	1,1	0,715
Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2	KRT17	6,1459	4,9256	1,2787	2,8119	4,4489	5,7925	1,1	0,897
Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1	LMNA	6,1459	2,9554	5,1148	4,6865	6,2285	3,8617	1,0	0,881
Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	HSP90AB1	6,1459	6,8958	7,6722	8,4357	6,2285	6,7579	1,0	0,782
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	TUBB	14,34	14,777	17,902	17,809	15,126	15,447	1,0	0,763
Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1	PDIA6	4,0973	0,98512	1,2787	1,8746	2,6694	1,9308	1,0	0,972
Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Homo sapiens GN=EIF4A2 PE=1 SV=2	EIF4A2	4,0973	3,9405	1,2787	2,8119	1,7796	4,8271	1,0	0,980

Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4	VCP	26,632	18,717	25,574	16,871	27,583	26,066	1,0	0,976
4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=1 SV=3	SLC3A2	3,0729	4,9256	1,2787	2,8119	4,4489	1,9308	1,0	0,983
Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1	TUBB4B	9,2188	10,836	10,23	8,4357	9,7876	11,585	1,0	0,885
Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	PKM	10,243	9,8512	17,902	11,248	12,457	13,516	1,0	0,928
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2	PPIA	10,243	10,836	17,902	12,185	12,457	13,516	1,0	0,918
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	ACTB	40,973	48,271	43,476	41,241	44,489	43,444	1,0	0,641
Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens GN=MIF PE=1 SV=4	MIF	2,0486	1,9702	2,5574	1,8746	3,5591	0,96542	1,0	0,943
14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1	YWHAZ	7,1702	7,881	5,1148	3,7492	8,0081	7,7233	1,0	0,894
Cluster of Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2 (TBB5_HUMAN)	TUBB	17,413	15,762	19,18	17,809	15,126	16,412	0,9	0,469
Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3	TAGLN2	7,1702	5,9107	7,6722	8,4357	6,2285	4,8271	0,9	0,738
Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 PE=1 SV=3	PGK1	7,1702	3,9405	5,1148	4,6865	5,3387	4,8271	0,9	0,660
Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2	HSPB1	4,0973	1,9702	5,1148	5,6238	2,6694	1,9308	0,9	0,838

Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2	ANXA2	21,511	24,628	24,295	20,621	17,796	24,135	0,9	0,276
Stomatin-like protein 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=STOML2 PE=1 SV=1	STOML2	5,1216	5,9107	3,8361	6,5611	2,6694	3,8617	0,9	0,672
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	HSPA5	7,1702	7,881	11,508	10,31	5,3387	7,7233	0,9	0,618
Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2	GSTP1	10,243	3,9405	8,9509	9,373	7,1183	3,8617	0,9	0,730
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	HNRNPA2B1	2,0486	0	1,2787	0,9373	0,88978	0,96542	0,8	0,780
Annexin A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=2	ANXA1	6,1459	3,9405	8,9509	3,7492	5,3387	5,7925	0,8	0,429
Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3	MDH2	6,1459	3,9405	5,1148	3,7492	4,4489	1,9308	0,7	0,161
Plectin OS=Homo sapiens GN=PLEC PE=1 SV=3	PLEC	2,0486	3,9405	2,5574	1,8746	1,7796	1,9308	0,7	0,157
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNPK PE=1 SV=1	HNRNPK	8,1945	1,9702	2,5574	2,8119	1,7796	2,8962	0,6	0,436
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	HSPD1	7,1702	13,792	11,508	7,4984	5,3387	5,7925	0,6	0,088
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1	ATP5A1	3,0729	0	5,1148	0,9373	1,7796	1,9308	0,6	0,480

Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=3	TKT	2,0486	4,9256	0	2,8119	0	0,96542	0,5	0,553
Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4	PDIA3	0	1,9702	3,8361	0	0,88978	1,9308	0,5	0,467
Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2	ANXA5	4,0973	2,9554	1,2787	0,9373	0,88978	1,9308	0,5	0,160
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	ALB	2,0486	1,9702	5,1148	0,9373	0,88978	1,9308	0,4	0,175

\* The significantly up-regulated proteins were defined according to the fold change ratio greater than 1.5, and p-value >0.05.

## 4.2 PRODUTO 2

O artigo 2, intitulado “: Leptin modulates expression of ubiquitin-proteasome system components in oral squamous cell carcinoma cells: a preliminary study” estudo preliminar. Este artigo está apresentado a seguir.



**Leptin modulates expression of ubiquitin-proteasome system components in oral squamous cell carcinoma cells: a preliminary study**

Rogério Gonçalves da Rocha<sup>1</sup>

Eliane Macedo Sobrinho Santos<sup>1,2</sup>

Marcela Gonçalves de Souza<sup>1</sup>

Tayslla Barbosa Moreira<sup>1</sup>

Sérgio Henrique Souza Santos<sup>3</sup>

Alfredo Maurício Batista de Paula<sup>1,4</sup>

André Luiz Sena Guimarães<sup>1,4#</sup>

Lucyana Conceição Farias<sup>1,4#</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Health Science, Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Campus Araçuaí, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>Institute of Agricultural Sciences, Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

# These authors have contributed equally to this work.

\*Corresponding author:

Lucyana Conceição Farias  
Universidade Estadual de Montes Claros  
Hospital Universitário Clemente de Faria  
Laboratório de Pesquisa em Saúde  
Avenida Cula Mangabeira, 562  
Montes Claros, Minas Gerais, Brasil  
Zip code: 39401-001  
Phone: +55 38 32248327  
E-mail: lucyanacfarias@gmail.com

### Abstract

Leptin, an important factor controlling energy homeostasis and feeding behavior and energy homeostasis, has been shown to promote proliferative phenotype in oral squamous cell carcinoma. Alongside this, ubiquitin-proteasome system mediates degradation of proteins regulating the cell cycle in biological processes and in cancer. Thus, we assessed if leptin can modulate the gene expression of UP system components and neoplastic behavior of OSCC cells. The OSCC cell lines were treated with recombinant leptin, and the expression levels of genes of the ubiquitin-proteasome system were quantified by qRT-PCR, including USP2, UBA, UBC, PSMD4, and PSME3. The cell viability and death assays were performed. The leptin favored neoplastic phenotype, accordingly with increase of mRNA expression of genes involved in proteasomal degradation pathway. The leptin-treated cells showed upregulation in mRNA expression of oncogenic protein USP2 and regulatory proteins of the cell cycle, UBA and UBC. The expression of proteasome proteins, PSME3 and PSMD4, was not modified by leptin. The *in silico* analysis was also analyzed, revealing an interaction network between leptin and UP system components. Our findings point that leptin can modulate the gene expression of ubiquitin-proteasome system components, suggesting this association as an important factor modifying the neoplastic behavior of OSCC cells.

## Introduction

The Ubiquitin-proteasome (UP) system is a protein degradation pathway fundamental to the intracellular protein homeostasis, being required to the regulation of several biological processes, as DNA repair, cell death, and cell cycle (1). This system acts through a molecular complex constituted by a set of ubiquitinases (UBs) and proteasome proteins, which recognizes and degrades ubiquitinated substrates in an ATP-dependent manner. To control proteasomal degradation, the deubiquitinases (DUBs) acts on this mechanism (2, 3). So, deregulations in cell processes regulated by UP system can be associated with pathological conditions, as metabolic changes and cancer (4, 5).

The degradation of cell cycle regulatory proteins, such as cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors are controlled by UB-mediated proteolytic degradation. This indicates an important role of ubiquitin in cell growth and apoptosis, and also in carcinogenesis pathway (6, 7)). Evidence shows the DUBs as oncogenic factors in cancer biology, impairing ubiquitination of the proteins of the cell cycle (8, 9), preventing degradation of cell cycle regulators, and leading to the deregulated progression of the cell cycle (10).

In oral carcinogenesis, UP system has aroused the interest of researchers due to possible involvement in disease pathogenesis. The overexpression of USP2a deubiquitinase was associated with tumor aggressiveness (11). The Proteasome alpha subunits (PSMAs) were also significantly upregulated in head and neck squamous cell carcinoma (12). Furthermore, the UBE2S ubiquitinase led to the increase of proliferative ability of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells by promotion of P21 degradation (13).

The leptin is a hormone factor, which has been implicated in oral carcinogenesis pathways (14, 15); it acts on OSCC cells, enhancing neoplastic behavior, as demonstrated by the increase in rates of cell proliferation, reduction in apoptosis and high expression levels of genes related to the proliferation, migration, and angiogenesis (16). Therefore, both molecular pathways UP system and leptin signaling plays essential and similar functions to the promotion of neoplastic growth through modulation of cell cycle (9, 17).

In the current study, we investigated, through *in silico* analysis, phenotypic and molecular assays, if leptin can modulate the gene expression of UP system components and neoplastic behavior of OSCC cells.

## Material and Methods

### *Bioinformatics analysis*

The bioinformatics tool String Database (<https://string-db.org/>, version 10.5) (18) was used to test the hypothesis that leptin interacts with ubiquitin-proteasome system components, aiming to conduct the *in vitro* assays with OSCC cells. Due to the interrelationship of some main proteins of UP system in OSCC pathogenesis, we selected the proteins USP2, UBA1, UBC, PSME3, and PSMD4 to explore the possibility of interactions network with leptin.

### *Cell Culture and leptin treatment*

The cells line derived from OSCC, SCC9 and SCC4 (CRL-1629 and CRL1624, ATCC cell bank, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham's F-12 Nutrient Mix (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics and 0.4µg/ml hydrocortisone (Gibco, South America), and maintained at 37°C in a humidified atmosphere 5% CO<sub>2</sub>. To performing of *in vitro* assays, OSCC cells were treated with recombinant human leptin 100 ng/mL (Invitrogen, USA), for 72 hours, as described previously (16).

### *MTT assay*

Cell viability was verified by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method. A density of  $1 \times 10^3$  OSCC cells was plated in 96-well plates, deprived of serum after 24 hours, and treated with leptin. Next, the cells were incubated with MTT solution for 4h; the supernatant was removed added DMSO to solubilize formazan crystals. The reading was determined by spectrophotometry at 540nm absorbance (19).

### *Cell Dead/viability assay*

A detection of cell death was performed by a colorimetric method using the acridine orange (AO) and ethidium bromide (EB) (Sigma, St. Louis, MO, USA). The cells were treated with 100ng/ml leptin for 72h, and posteriorly were incubated for 5 minutes with a solution containing 100 µg/ml Acridine Orange 100 µg/ml (AO, Sigma, St. Louis, MO, USA) and Ethidium Bromide Stock (EB, Sigma, St. Louis, MO, USA) (DOI: 10.1101/pdb.prot4493). Next, cells were visualized of cells in FSX100 fluorescence microscope The EB staining (Ex360-370, Em420-460, DM400 filter) indicates cell death, while the AO (Ex460-495,

Em510-550, DM505 filter) indicates live cells. The analysis was performed using ImageJ software (NIH; Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij/>) (20)

#### *RNA isolation and qRT-PCR*

RNA was isolated using Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer. The amount of 1,5µg of total RNA was reverse transcribed using Reverse Transcription Kit (Invitrogen by Life Technology, USA). For the qRT-PCR 50 µg of cDNA was used for mRNA quantification by the TaqMan assay on a StepOne system (Applied Biosystems, USA). We performed the gene expression assay of the following molecular markers: USP2 (Hs00899199\_g1), UBA1 (Hs01031318\_m1), UBC (Hs01871556\_s1), PSME3 (Hs00195072\_m1), and PSMD4 (Hs01937833\_s1). The beta-actin assay ACTB (Hs99999903\_m1) was used as reference gene. The comparative  $C_t$  method was applied to molecular analyses (21).

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using SPSS 18.0 software and GraphPad Prism software (Version 6.0, San Diego, CA, USA). The Shapiro-Wilk test was adopted to verify distribution samples. The T-test was used to analyze phenotypic and molecular assays. The probability values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

*Bioinformatics analysis reveals a possibility of activation of USP2 by leptin.*

The *in silico* analysis directed to the interaction between leptin and the oncogenic protein USP2 by activation. Through the binding leptin with its receptor LEPR, leptin connects with USP2, that establishes an unspecified interaction with UBC protein. So, UBC conducts to a network with UP system components, as UBA1, PSMD4, and PSME3 (Fig.1A).

*Leptin favors neoplastic phenotype, accordingly with increase of mRNA expression of genes involved in proteasomal degradation pathway*

The leptin treatment was able to increase the cell viability and reduces the death of OSCC cells when compared to untreated cells (Fig. 1B and Fig. 1C). Accordingly, with this phenotype changes, leptin-treated cells showed upregulation in mRNA expression of oncogenic protein USP2 and regulatory proteins of the cell cycle, UBA and UBC. The expression of the other proteasome proteins investigated, PSME3 and PSMD4, was not modified by leptin (Fig. 1D).

## Discussion

In this study, we evaluated the neoplastic behavior of leptin in counterpart to its function modulating the UP system. In order, to defined this study purpose, we took a bioinformatic approach to delineate the hypothesis linking leptin with the main same UP system components. These two particular targets were our study focus, once both leptin and UP system are involved in cancer growth and cell cycle deregulation in oral carcinogenesis (9, 17). A possible activator role of leptin targeting USP2 was proposed by our *in silico* analysis, which also revealed a molecular network between leptin, deubiquitinating and ubiquitinating enzymes and proteasomal proteins.

The study findings revealed that leptin treatment upregulated the mRNA expression of USP2, UBA, and UBC in OSCC cells.

The deubiquitinating enzyme USP2 acts removing ubiquitin from target substrates and impairing proteasomal degradation. The proteins of cell cycle, as cyclin D1, has been shown to be targeted by USP2, which leads to the protein stabilization and cell accumulation of cyclin D1 (9). This molecular mechanism is strongly associated with tumorigenesis (10). The USP2 presented an clinicopathological significance in OSCC patients, being associated with presence of metastatic cervical lymph nodes (11). Our study showed the leptin related to the increased expression of USP2 in OSCC cells. In view of the role of this deubiquitinase in cell cycle, the increase in cell proliferation promoted by leptin can be linked to changes in the USP2 expression. This research approach was also previously investigated in the breast cancer, showing USP2 as a key regulator of cyclin D1 by adiponectin and leptin (22). However, in oral carcinogenesis this pathway had not yet been investigated.

In addition to USP2, we show that leptin enhances mRNA expression of other UP system related-proteins, including the ubiquitinases, UBA and UBC.

The ubiquitination plays a critical role in the control of cell death, cell survival and proliferation, through modulation of apoptosis, autophagy and cell cycle progression (2, 23). The ubiquitination of target proteins is dependent of the amount and activity of UBA1. Interestingly, only low levels of active UBA1 are required to ubiquitinate the majority of substrates (24). Additionally, tumor suppressors and oncogenes involved in tumorigenesis interact with enzymes of the UP system and ubiquitin-mediated pathways (24). UBA can be associated with a degradation of inhibitory protein of cell cycle since it interrelationships with several pathways promoting proteasomal degradation (25). Studies do not revealed the role of the UBA in oral carcinogenesis. So, it is important better investigate the real significance of this association between leptin and increase of mRNA expression of this enzyme.

In our study, we found a higher expression of UBC in the leptin-treated cells. A study demonstrated that UBC inhibition promoted the suppression in cell growth and greater radiosensitivity in lung cancer. Thus, UBC overexpression can cause radioresistance in neoplastic cells (26). There is a studies scarcity investigating the role of UBC in oral cancer.

Although proteasomal proteins are overexpressed in OSCC carcinoma (27), in our study, leptin does not modified mRNA expression of PSMD4 and PSME3.

In summary, our finding points to evidence that leptin can modulate the gene expression of ubiquitin-proteasome system components, suggesting this association as an important factor modifying the neoplastic behavior of OSCC cells. However, functional analysis and in vivo assays are necessary in order to better understand the biological impact of this mechanisms connection in oral carcinogenesis.



## Figures List

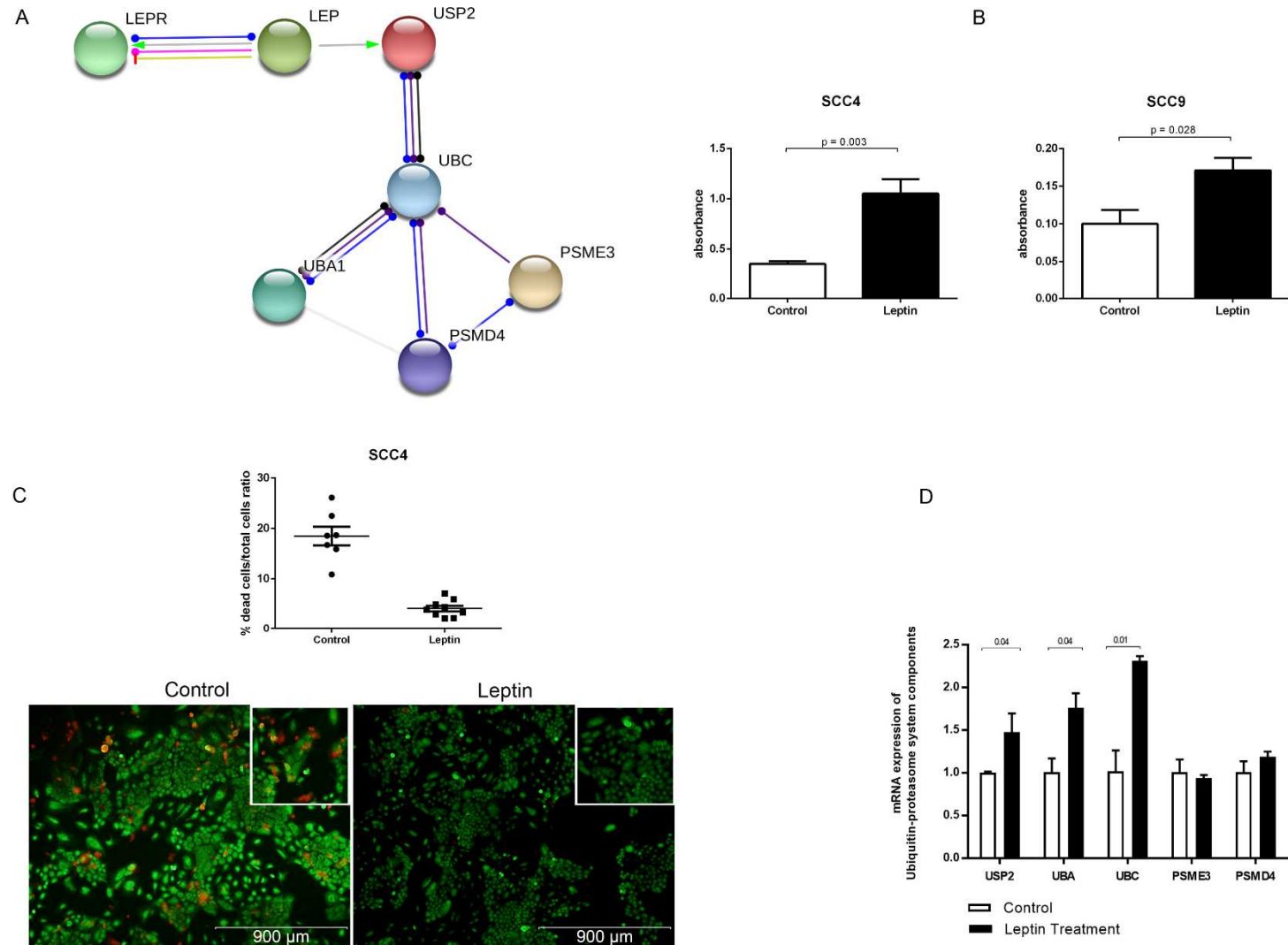
**Fig 1.** (A) *In silico* analysis showing the interaction between leptin (Lep), its receptor LepR and ubiquitin-proteasome system components, USP2, UBA, UBC, PSME3 and PSMD4. Red bar at end of the arrow indicates inhibition and activation represented by a green arrow. Circle represents that the directionality of the interaction is known, but the result of the interaction is unknown (e.g., if it is up- or down-regulated). (B) Proliferative behavior of leptin-treated OSCC cells (C) Cell Dead/viability assay by colorimetry with acridine orange (AO) and ethidium bromide (EB). AO is able to penetrate into cells emitting green fluorescence. EB emits red fluorescence. (D) mRNA expression of genes of the Ubiquitin-proteasome system. Significance was determined using T-test; statistical significance:  $p < 0.05$ .

## References

1. Motegi A, Murakawa Y, Takeda S. The vital link between the ubiquitin-proteasome pathway and DNA repair: impact on cancer therapy. *Cancer letters*. 2009;283(1):1-9.
2. Ding F, Xiao H, Wang M, Xie X, Hu F. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in cancer development and treatment. *Frontiers in bioscience*. 2014;19:886-95.
3. Johnson DE. The ubiquitin-proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. *Endocrine-related cancer*. 2015;22(1):T1-17.
4. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *Journal of cellular biochemistry Supplement*. 2000;34:40-51.
5. Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(1):13-25.
6. Diehl JA, Fuchs SY, Haines DS. Ubiquitin and cancer: new discussions for a new journal. *Genes & cancer*. 2010;1(7):679-80.
7. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:425-79.
8. Kim J, Kim WJ, Liu Z, Loda M, Freeman MR. The ubiquitin-specific protease USP2a enhances tumor progression by targeting cyclin A1 in bladder cancer. *Cell cycle*. 2012;11(6):1123-30.
9. Shan J, Zhao W, Gu W. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. *Molecular cell*. 2009;36(3):469-76.
10. Lee JT, Shan J, Gu W. Targeting the degradation of cyclin D1 will help to eliminate oncogene addiction. *Cell cycle*. 2010;9(5):857-8.
11. da Silva SD, Cunha IW, Nishimoto IN, Soares FA, Carraro DM, Kowalski LP, et al. Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Oral oncology*. 2009;45(10):e134-9.
12. Li Y, Huang J, Sun J, Xiang S, Yang D, Ying X, et al. The transcription levels and prognostic values of seven proteasome alpha subunits in human cancers. *Oncotarget*. 2017;8(3):4501-19.
13. Yoshimura S, Kasamatsu A, Nakashima D, Iyoda M, Kasama H, Saito T, et al. UBE2S associated with OSCC proliferation by promotion of P21 degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;485(4):820-5.
14. Domingos PL, Farias LC, Pereira CS, das Gracias Pena G, Reis TC, Silva RR, et al. Leptin receptor polymorphism Gln223Arg (rs1137101) in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant oral lesions. *SpringerPlus*. 2014;3:683.
15. Kaur J, Jacobs R. Salivary and serum leptin levels in patients with squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. *Clinical oral investigations*. 2016;20(1):39-42.
16. Sobrinho Santos EM, Guimaraes TA, Santos HO, Cangussu LMB, de Jesus SF, Fraga CAC, et al. Leptin acts on neoplastic behavior and expression levels of genes related to hypoxia, angiogenesis, and invasiveness in oral squamous cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017;39(5):1010428317699130.
17. Li Z, Shen J, Wu WK, Yu X, Liang J, Qiu G, et al. Leptin induces cyclin D1 expression and proliferation of human nucleus pulposus cells via JAK/STAT, PI3K/Akt and MEK/ERK pathways. *PLoS one*. 2012;7(12):e53176.
18. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D447-52.
19. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in molecular biology*. 2011;731:237-45.
20. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth*. 2012;9(7):671-5.

21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
22. Nepal S, Shrestha A, Park PH. Ubiquitin specific protease 2 acts as a key modulator for the regulation of cell cycle by adiponectin and leptin in cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;412:44-55.
23. Teixeira LK, Reed SI. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annual review of biochemistry*. 2013;82:387-414.
24. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annual review of biochemistry*. 1992;61:761-807.
25. Buchberger A. From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends in Cell Biology*.12(5):216-21.
26. Tang Y, Geng Y, Luo J, Shen W, Zhu W, Meng C, et al. Downregulation of ubiquitin inhibits the proliferation and radioresistance of non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Scientific reports*. 2015;5:9476.
27. Vtiurin BM, Karelin EA, Ivanov VN, Karasev VI, Berkutov VL, Ivanova LF, et al. [The technology of preparation and experience in the clinical use of <sup>252</sup>Cf sources]. *Meditssinskaia radiologiya*. 1989;34(9):60-4.

Figure 1



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A radiação ionizante é uma estratégia terapêutica utilizada no tratamento do carcinoma epidermoide de boca. Há uma escassez de estudos que associem o efeito da leptina à modalidade terapêutica adjuvante em linhagens de carcinoma de células escamosas. Sendo esse hormônio um controlador do balanço energético e o peso corporal, ele ativa vias que convergem para a proliferação, migração e angiogênese. Os resultados desse estudo demonstraram que a leptina pode comprometer o efeito da radiação ionizante, possivelmente, pelo aumento de ACTC1, KRT6A e EEF2. Observou-se, ainda, que a leptina diminuiu as espécies reativas de oxigênio em células expostas à radiação.

A leptina atuou em Usp2, UBA e UBC, mostrando um possui um papel sobre mecanismos de degradação proteolítica no carcinoma epidermoide de boca.

Esse estudo apresentou uma nova abordagem molecular, destacando a leptina como um fator importante que compromete a responsividade de células de CEB à radiação ionizante terapêutica. Destaca, ainda, esse hormônio como um modulador da expressão de componentes do sistema de ubiquitina-proteassoma, sugerindo esta associação como um fator que pode modificar o comportamento neoplásico das células de CEB. No entanto, análises funcionais e ensaios *in vivo* são necessários para melhor entender o impacto biológico dessa conexão de mecanismos na carcinogênese de boca, bem como a real importância da leptina em eventos moleculares relacionados aos efeitos da radiação no câncer bucal.

## REFERÊNCIAS

1. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontology* 2000. 2011;57(1):19-37.
2. Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology. *Oral oncology*. 2007;43(2):107-15.
3. Yu CC, Huang HB, Hung SK, Liao HF, Lee CC, Lin HY, et al. AZD2014 Radiosensitizes Oral Squamous Cell Carcinoma by Inhibiting AKT/mTOR Axis and Inducing G1/G2/M Cell Cycle Arrest. *PloS one*. 2016;11(3):e0151942.
4. Argiris A, Eng C. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer treatment and research*. 2003;114:15-60.
5. Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head & neck*. 2006;28(3):256-69.
6. Roberg K, Jonsson AC, Grenman R, Norberg-Spaak L. Radiotherapy response in oral squamous carcinoma cell lines: evaluation of apoptotic proteins as prognostic factors. *Head & neck*. 2007;29(4):325-34.
7. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(5):401-21.
8. Walvik L, Svensson AB, Friberg J, Lajer CB. The association between human papillomavirus and oropharyngeal squamous cell Carcinoma: Reviewed according to the Bradford Hill criteria for causality. *Oral oncology*. 2016;63:61-5.
9. Li Z, Shen J, Wu WK, Yu X, Liang J, Qiu G, et al. Leptin induces cyclin D1 expression and proliferation of human nucleus pulposus cells via JAK/STAT, PI3K/Akt and MEK/ERK pathways. *PloS one*. 2012;7(12):e53176.
10. Shan J, Zhao W, Gu W. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. *Molecular cell*. 2009;36(3):469-76.
11. da Silva SD, Cunha IW, Nishimoto IN, Soares FA, Carraro DM, Kowalski LP, et al. Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Oral oncology*. 2009;45(10):e134-9.
12. Domingos PL, Farias LC, Pereira CS, das Gracas Pena G, Reis TC, Silva RR, et al. Leptin receptor polymorphism Gln223Arg (rs1137101) in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant oral lesions. *SpringerPlus*. 2014;3:683.
13. Sobrinho Santos EM, Guimaraes TA, Santos HO, Cangussu LMB, de Jesus SF, Fraga CAC, et al. Leptin acts on neoplastic behavior and expression levels of genes related to hypoxia, angiogenesis, and invasiveness in oral squamous cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017;39(5):1010428317699130.
14. Fazolini NP, Cruz AL, Werneck MB, Viola JP, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Leptin activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid droplet formation, cytokine production and increased cell proliferation. *Cell cycle*. 2015;14(16):2667-76.
15. Stolzenberg-Solomon RZ, Newton CC, Silverman DT, Pollak M, Nogueira LM, Weinstein SJ, et al. Circulating Leptin and Risk of Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis From 3 Cohorts. *American journal of epidemiology*. 2015;182(3):187-97.
16. Habib CN, Al-Abd AM, Tolba MF, Khalifa AE, Khedr A, Mosli HA, et al. Leptin influences estrogen metabolism and accelerates prostate cell proliferation. *Life sciences*. 2015;121:10-5.

17. Yuan HJ, Sun KW, Yu K. Leptin promotes the proliferation and migration of human breast cancer through the extracellular-signal regulated kinase pathway. *Molecular medicine reports*. 2014;9(1):350-4.
18. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics, 2017*. CA: a cancer journal for clinicians. 2017;67(1):7-30.
19. Yu MA, Kiang A, Wang-Rodriguez J, Rahimy E, Haas M, Yu V, et al. Nicotine promotes acquisition of stem cell and epithelial-to-mesenchymal properties in head and neck squamous cell carcinoma. *PloS one*. 2012;7(12):e51967.
20. Mallery SR, Tong M, Michaels GC, Kiyani AR, Hecht SS. Clinical and biochemical studies support smokeless tobacco's carcinogenic potential in the human oral cavity. *Cancer prevention research*. 2014;7(1):23-32.
21. Gupta B, Johnson NW. Systematic review and meta-analysis of association of smokeless tobacco and of betel quid without tobacco with incidence of oral cancer in South Asia and the Pacific. *PloS one*. 2014;9(11):e113385.
22. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429-35.
23. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. CA: a cancer journal for clinicians. 2011;61(2):69-90.
24. Brasil. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil*. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA; 2015. p. 122.
25. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA: a cancer journal for clinicians. 2002;52(4):195-215.
26. Speight PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head and neck pathology*. 2007;1(1):61-6.
27. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2006;174(3):341-8.
28. Irani S. Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis. *Iranian journal of pathology*. 2016;11(4):303-22.
29. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2004;40(1):13-20.
30. Webber LP, Wagner VP, Curra M, Vargas PA, Meurer L, Carrard VC, et al. Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology*. 2017;71(2):278-86.
31. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of dental research*. 2008;87(1):14-32.
32. Kang FW, Gao Y, Que L, Sun J, Wang ZL. Hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression indicates poor clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine*. 2013;5(1):112-8.
33. Kim SH, Cho NH, Kim K, Lee JS, Koo BS, Kim JH, et al. Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Journal of surgical oncology*. 2006;93(4):330-7.
34. Evan G, Harrington E, Fanidi A, Land H, Amati B, Bennett M. Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1994;345(1313):269-75.

35. Zhang X, Jung IH, Hwang YS. EGF enhances low-invasive cancer cell invasion by promoting IMP-3 expression. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(2):2555-63.
36. Sugerman PB, Joseph BK, Savage NW. Review article: The role of oncogenes, tumour suppressor genes and growth factors in oral squamous cell carcinoma: a case of apoptosis versus proliferation. *Oral diseases*. 1995;1(3):172-88.
37. Nayak S, Goel MM, Makker A, Bhatia V, Chandra S, Kumar S, et al. Fibroblast Growth Factor (FGF-2) and Its Receptors FGFR-2 and FGFR-3 May Be Putative Biomarkers of Malignant Transformation of Potentially Malignant Oral Lesions into Oral Squamous Cell Carcinoma. *PloS one*. 2015;10(10):e0138801.
38. Shiah SG, Hsiao JR, Chang WM, Chen YW, Jin YT, Wong TY, et al. Downregulated miR329 and miR410 promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting Wnt-7b. *Cancer research*. 2014;74(24):7560-72.
39. Nagler RM. Molecular aspects of oral cancer. *Anticancer research*. 2002;22(5):2977-80.
40. Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral oncology*. 2003;39(3):222-31.
41. Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez J, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avilla I, Sanchez-Fernandez E. Expression of the p53 protein in oral squamous cell carcinomas associated with Epstein-Barr virus. *Microbios*. 2000;102(403):147-54.
42. Solomon MC, Vidyasagar MS, Fernandes D, Guddattu V, Mathew M, Shergill AK, et al. The prognostic implication of the expression of EGFR, p53, cyclin D1, Bcl-2 and p16 in primary locally advanced oral squamous cell carcinoma cases: a tissue microarray study. *Medical oncology*. 2016;33(12):138.
43. Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future oncology*. 2012;8(11):1407-25.
44. Diehl JA, Fuchs SY, Haines DS. Ubiquitin and cancer: new discussions for a new journal. *Genes & cancer*. 2010;1(7):679-80.
45. Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15(4):774-81.
46. Lee DJ, Lee HM, Kim JH, Park IS, Rho YS. Heavy alcohol drinking downregulates ALDH2 gene expression but heavy smoking up-regulates SOD2 gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *World journal of surgical oncology*. 2017;15(1):163.
47. Wright SC, Zhong J, Zheng H, Larrick JW. Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1993;7(11):1045-51.
48. Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Molecular cancer*. 2010;9:144.
49. Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(10):3187-92.
50. Boscolo-Rizzo P, Del Mistro A, Bussu F, Lupato V, Baboci L, Almadori G, et al. New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*. 2013;33(2):77-87.





51. Lam KY, Law SY, So MK, Fok M, Ma LT, Wong J. Prognostic implication of proliferative markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1996;77(1):7-13.
52. Lopez-Saez JF, de la Torre C, Pincheira J, Gimenez-Martin G. Cell proliferation and cancer. *Histology and histopathology*. 1998;13(4):1197-214.
53. Rozengurt E. Growth factors, cell proliferation and cancer: an overview. *Molecular biology & medicine*. 1983;1(1):169-81.
54. Ramos-Garcia P, Gil-Montoya JA, Scully C, Ayen A, Gonzalez-Ruiz L, Navarro-Trivino FJ, et al. An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis. *Oral diseases*. 2017;23(7):897-912.
55. Trepast X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. *Comprehensive Physiology*. 2012;2(4):2369-92.
56. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral oncology*. 1999;35(3):227-33.
57. Rich AM, Reade PC. Epithelial-mesenchymal interactions in experimental oral mucosal carcinogenesis. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2001;30(7):389-97.
58. Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1654(1):13-22.
59. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Cancer*. 2013;4(1):66-83.
60. Carlile J, Harada K, Baillie R, Macluskey M, Chisholm DM, Ogden GR, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2001;30(8):449-57.
61. Kim SK, Park SG, Kim KW. Expression of vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2015;41(1):11-8.
62. Polverini PJ. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of dental education*. 2002;66(8):962-75.
63. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(12).
64. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in oncology*. 2002;29(6 Suppl 16):15-8.
65. Webb AH, Gao BT, Goldsmith ZK, Irvine AS, Saleh N, Lee RP, et al. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma. *BMC cancer*. 2017;17(1):434.
66. Juhasz A, Bardos H, Repassy G, Adany R. Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. *The Laryngoscope*. 2000;110(1):84-92.
67. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
68. Dutta D, Ghosh S, Pandit K, Mukhopadhyay P, Chowdhury S. Leptin and cancer: Pathogenesis and modulation. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2012;16(Suppl 3):S596-600.
69. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2007;8(1):21-34.

70. Niswender KD, Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2003;24(1):1-10.
71. Ogunwobi OO, Beales IL. Leptin stimulates the proliferation of human oesophageal adenocarcinoma cells via HB-EGF and Tgfbeta mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *British journal of biomedical science*. 2008;65(3):121-7.
72. Chen Q, Zhuang H, Liu Y. The association between obesity factor and esophageal cancer. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2012;3(3):226-31.
73. Anagnostoulis S, Karayiannakis AJ, Lambropoulou M, Efthimiadou A, Polychronidis A, Simopoulos C. Human leptin induces angiogenesis in vivo. *Cytokine*. 2008;42(3):353-7.
74. Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circulation research*. 1998;83(10):1059-66.
75. Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(11):6390-5.
76. Jahng JW, Choi SH, Cha MJ, Kim NY, Hwang SJ, Lee JH. Serotonin transporter mRNA expression in the dorsal raphe nucleus of a tumor bearing mouse. *Experimental & molecular medicine*. 2005;37(1):65-9.
77. Mullen M, Gonzalez-Perez RR. Leptin-Induced JAK/STAT Signaling and Cancer Growth. *Vaccines*. 2016;4(3).
78. Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C. Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2007;3(4):345-54.
79. Yeh WL, Lu DY, Lee MJ, Fu WM. Leptin induces migration and invasion of glioma cells through MMP-13 production. *Glia*. 2009;57(4):454-64.
80. Ahn JH, Choi YS, Choi JH. Leptin promotes human endometrial cell migration and invasion by up-regulating MMP-2 through the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Molecular human reproduction*. 2015;21(10):792-802.
81. Lu J, Park CS, Lee SK, Shin DW, Kang JH. Leptin inhibits 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Neuroscience letters*. 2006;407(3):240-3.
82. Yang WH, Chen JC, Hsu KH, Lin CY, Wang SW, Wang SJ, et al. Leptin increases VEGF expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840(12):3483-93.
83. Candelaria PV, Rampoldi A, Harbuzariu A, Gonzalez-Perez RR. Leptin signaling and cancer chemoresistance: Perspectives. *World journal of clinical oncology*. 2017;8(2):106-19.
84. Harmon T, Harbuzariu A, Lanier V, Lipsey CC, Kirilin W, Yang L, et al. Nanoparticle-linked antagonist for leptin signaling inhibition in breast cancer. *World journal of clinical oncology*. 2017;8(1):54-66.
85. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:425-79.
86. Goldberg AL. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *The Journal of cell biology*. 2012;199(4):583-8.
87. Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*. 2009;458(7237):438-44.
88. Chung CH, Baek SH. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;266(3):633-40.
89. Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ, et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer cell*. 2004;5(3):253-61.

90. Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *The Biochemical journal*. 2000;345 Pt 1:1-15.
91. Li J, Feng X, Sun C, Zeng X, Xie L, Xu H, et al. Associations between proteasomal activator PA28gamma and outcome of oral squamous cell carcinoma: Evidence from cohort studies and functional analyses. *EBioMedicine*. 2015;2(8):851-8.
92. Dai W, Li Y, Zhou Q, Xu Z, Sun C, Tan X, et al. Cetuximab inhibits oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis via degradation of epidermal growth factor receptor. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2014;43(4):250-7.
93. Magiera K, Tomala M, Kubica K, De Cesare V, Trost M, Zieba BJ, et al. Lithocholic Acid Hydroxyamide Destabilizes Cyclin D1 and Induces G0/G1 Arrest by Inhibiting Deubiquitinase USP2a. *Cell chemical biology*. 2017;24(4):458-70 e18.
94. Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *Journal of cellular physiology*. 2009;220(2):292-6.
95. Vikram B. Adjuvant therapy in head and neck cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1998;48(4):199-209.
96. Ishigami T, Uzawa K, Fushimi K, Saito K, Kato Y, Nakashima D, et al. Inhibition of ICAM2 induces radiosensitization in oral squamous cell carcinoma cells. *British journal of cancer*. 2008;98(8):1357-65.
97. Huang A, Glick SA. Genetic susceptibility to cutaneous radiation injury. *Archives of dermatological research*. 2017;309(1):1-10.
98. Hiro J, Inoue Y, Toiyama Y, Miki C, Kusunoki M. Mechanism of resistance to chemoradiation in p53 mutant human colon cancer. *International journal of oncology*. 2008;32(6):1305-10.
99. Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T, Wong DT. Cyclin D1 overexpression associates with radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*. 2001;96(3):159-65.
100. Yu W, Cao DD, Li QB, Mei HL, Hu Y, Guo T. Adipocytes secreted leptin is a pro-tumor factor for survival of multiple myeloma under chemotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(52):86075-86.

## ANEXO

ANEXO A – Aprovação da pesquisa pelo comitê de ética local da Universidade Estadual de Montes Claros / Brasil (número de protocolo: CAAE: 35440514.2.0000.5146).

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
<b>Título da Pesquisa:</b> Estudo da Via de Sinalização da Leptina no Carcinoma Epidermóide de Boca e em Tumores Odontogênicos	
<b>Pesquisador Responsável:</b> Lucyana Conceição Farias	
<b>Área Temática:</b> Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.)	
<b>Versão:</b> 1	
<b>CAAE:</b> 35440514.2.0000.5146	
<b>Submetido em:</b> 31/08/2014	
<b>Instituição Proponente:</b> Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES	
<b>Situação da Versão do Projeto:</b> Aprovado	
<b>Localização atual da Versão do Projeto:</b> Pesquisador Responsável	
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio	
	
	Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_362827