

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/07/2025.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

JULIANA POLIZEL OCANHA XAVIER

**Os receptores de vitamina D e retinoide X alfa em
lesões malignas e benignas de pele: Análise
Imunohistoquímica e Transcriptômica**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques

Juliana Polizel Ocanha Xavier

Os receptores de vitamina D e retinoide X alfa em lesões malignas e benignas de pele: Análise Imunohistoquímica e Transcriptômica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Mariângela Esther Alencar Marques
Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Márcia Guimarães da Silva

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Xavier, Juliana Polizel Ocanha.

Os receptores de vitamina D e retinoide X alfa em lesões malignas e benignas de pele : análise imunohistoquímica e transcriptômica / Juliana Polizel Ocanha Xavier. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Mariângela Esther Alencar Marques

Coorientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40105008

1. Imunohistoquímica. 2. Perfilação da expressão gênica. 3. Receptor X retinoide alfa. 4. Vitamina D.

Palavras-chave: Imunohistoquímica; Receptor de vitamina D; Receptor retinoide X; Transcriptômica.

A meus pais, João e Silvia e meu irmão Eduardo, a gratidão por tudo o que fizeram por mim.

A meu marido por sempre me incentivar a realizar meus sonhos.

A meu filho, Joaquim, que participou enquanto dormia à elaboração dessa tese, nosso amor mais puro e motivo da nossa alegria.

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Dra. Mariângela Esther Alencar Marques, pela amizade e exemplo de competência profissional

Ao pesquisador Dr. José Cândido Caldeira Xavier Jr pela realização em tempos pandêmicos da análise imuno-histoquímica e todo o apoio e crítica construtiva ao projeto

À Professora Dra. Márcia Guimarães da Silva pelo apoio na obtenção do auxílio Fapesp e pela idealização do teste molecular

À secretária Cristina A. Alquati Dorico pelo apoio simpático de sempre com as correspondências e à auxiliar aposentada Rita de Cássia de Moraes pela coleta dos blocos.

Ao Instituto de Patologia de Araçatuba por me permitir realizar parte do projeto em suas dependências.

À Secretária Vânia A. Soler pela atenção e gentileza.

Ao estatístico Prof. Dr. José Eduardo Corrente pela presteza na realização das análises estatísticas.

A Eduardo Henrique Carlos de Almeida pelos desenhos gráficos.

Ao biólogo Márcio de Carvalho, do Laboratório de Análise de Transcritoma Multiusuários da UNIPEX – FMB – UNESP

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela viabilização do projeto.

“Estrelas são os olhos de

Deus vigiando para que corra tudo bem. Para sempre.

E, como se sabe, “sempre” não acaba nunca.”

Como nasceram as estrelas / Doze lendas brasileiras - Página 6, de Clarice

Lispector – Escrito em 1976 – Edição da Editora Nova fronteira - 40 páginas

INTRODUÇÃO: A vitamina D se liga a seu receptor (VDR) para exercer suas funções e este se heterodimeriza com um receptor retinoide X (RXR α) e desta forma, em heterodimero, atua em regiões genéticas responsivas a vitamina D (VDRE) ativando ou inibindo transcrições gênicas. A principal fonte de vitamina D é a exposição à radiação ultravioleta, mas a mesma também é a principal causadora de cânceres de pele. Entretanto, diversos estudos, principalmente experimentais demonstraram efeito antiproliferativo, pró-apoptótico, anti-angiogênico e favorável a senescência celular pela vitamina D e seus metabólitos em células de melanoma. Da mesma forma, estudos demonstraram atividade antiproliferativa dos retinoides e seus análogos, levando, inclusive, a seu uso em transplantados renais e em algumas síndromes cutâneas, visando a prevenção de cânceres de pele, especialmente os não melanoma.

OBJETIVO: Analisar a expressão do VDR e do RXR α em lesões de pele não melanocíticas (queratose actínica, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular) e melanocíticas (nevo intradérmico, nevo displásico e melanoma) através de análise imuno-histoquímica e transcriptômica e compará-las a grupo controle.

MÉTODOS: Estudo retrospectivo transversal, com materiais histopatológicos embebidos em parafina provenientes de exéreses realizadas entre 2012 a 2018, no Hospital das Clínicas de Botucatu, da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Foi considerado controle o grupo de peles provenientes de ampliação de margem de melanomas, com ausência de qualquer lesão no material. Após

todos os grupos serem submetidos aos critérios de inclusão e exclusão, foram submetidos à análise imuno-histoquímica para VDR da marca Abcam e RXR α da marca Novus Biologicals. Foram considerados positivos os casos cujo escore, que observava intensidade e porcentagem de positividade das células, fosse maior que 4. Posteriormente, alguns grupos foram selecionados para análise molecular em plataforma para análise múltipla de RNAm (Nanostring®). Para esta etapa foram selecionados outros 20 genes correlacionados a VDR e RXR α e mais 2 genes housekeeping (GAPDH e B-actina) para terem seus respectivos RNAm analisados em conjunto. Os genes selecionados foram: NCOA1, NCOA2, NCOA3, NCOR1, NCOR2, RAR A, RAR B, RAR G, RXR G, MED1, SMAD3, FOXO3, CYP27B1, CYP24A1, AhR, XPA, XPC, TP53, CREBB e EP300. Todos os dados foram submetidos a análise estatística, considerando $p < 0,05$ significativo. O trabalho foi submetido e aprovado no comitê de Ética da instituição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Nas lesões não melanocíticas, ocorreu perda de RXR α nas queratoses actínicas e perda de ambos os receptores no carcinoma espinocelular. Estes dados favorecem a hipótese de que a vitamina D seria importante no processo de carcinogênese das lesões escamosas. Nas lesões melanocíticas, se observou perda de ambos os receptores em todas as lesões quando comparadas ao grupo controle. Houve correlação estatística da perda dos receptores com a exposição solar, corroborado pela análise do grupo controle em separado. Houve também correlação significativa entre VDR nuclear e regressão histológica, bem como correlação inversa entre RXR α e mitoses. Estas informações favorecem a hipótese de que a exposição solar seria um fator

fundamental na perda dos mecanismos de proteção do VDR e RXR α e que provavelmente essa perda ocorra no início da formação das lesões melanocíticas já que não houve diferença estatística entre as lesões avaliadas, a despeito de sua malignidade ou benignidade. Por fim, a análise transcriptômica comprovou a perda de VDR e RXR α nas lesões melanocíticas (nevo intradérmico e melanoma) e demonstrou perda de VDR e RXR α também em carcinomas basocelulares e espinocelulares. Houve diferença estatística com relação a maioria dos RNAm analisados comparando as lesões com o controle, porém quando comparamos as lesões entre si, carcinoma basocelular se diferenciou de carcinoma espinocelular, mas nevo intradérmico não se diferenciou de melanoma. Houve também diminuição de FOXO3, TP53 e XPC nos melanomas. CONCLUSÃO: A expressão de VDR e RXR α se demonstrou afetada pela exposição solar, mecanismo pelo qual poderia haver diminuição dos efeitos protetivos da vitamina D e RXR α . Os resultados da análise imunohistoquímica foram corroborados pelos da análise transcriptômica, indicando um importante papel do VDR e RXR α na carcinogênese das lesões escamosas de pele. Com relação às lesões melanocíticas, a perda dos receptores provavelmente não se relaciona ao processo de carcinogênese, haja vista que não houve apresentação diferencial deles nas lesões benignas se comparadas às malignas. A maior compreensão desta via fisiopatogênica abre oportunidade para novos estudos e pesquisas, podendo se tornar alvo de estratégias terapêuticas.

Palavras chave: receptores de calcitriol, receptor x retinoide alfa, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas, melanoma

BACKGROUND: Vitamin D connects to its receptor (VDR) to exert its activities and heterodimerizes with a retinoid X receptor (RXR α), and acts, as a heterodimer, in vitamin D responsive elements (VDRE) activating or inhibiting genic transcriptions. The main source of vitamin D is ultraviolet radiation exposure, but it is the same main cause of skin cancers. Therefore, multiples studies, especially experimental ones showed antiproliferative, proapoptotic, antiangiogenic effects, favorable to cell senescence by vitamin D and its metabolites in melanoma cells. In the same way, studies have demonstrated antiproliferative activity from retinoids and its analogues, leading to their use in kidney transplantation patients and also in some cutaneous syndromes, aiming skin cancer prevention, primary against non-melanoma cancers.

OBJECTIVE: To analyze VDR and RXR α expression in non-melanocytic skin lesions (actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma) and melanocytic (intra-dermal nevi, dysplastic nevi and melanoma) through immunohistochemistry and transcriptomic analysis and compare it to the control group.

METHODS: Retrospective transversal study, with formalin fixed and paraffin embedded material from excision realized between 2012 and 2018 in Botucatu Clinical Hospital, from Botucatu Medicine Faculty (UNESP). The control group consisted of skin provided by margin ampliation of melanomas, when there was not any lesion remained. After all groups were submitted to inclusion and exclusion criteria, they were submitted to immunohistochemistry analysis of VDR (Abcam®) and RXR α (Novus Biologicals®). There were considered positive cases which the score, that observed intensity and percentage of positive cells,

was above 4. Finally, some groups were selected to molecular analysis in multiple mRNA platform analyzer (Nanostring®). In this stage, there were selected other 20 genes correlated to VDR and RXR α and two other housekeeping genes (GAPDH and B-actine)

to have their respective mRNA analyzed together. The genes selected were: NCOA1, NCOA2, NCOA3, NCOR1, NCOR2, RAR A, RAR B, RAR G, RXR G, MED1, SMAD3, FOXO3, CYP27B1, CYP24A1, AhR, XPA, XPC, TP53, CREBB and EP300. All data were submitted to statistical analysis and $p < 0,05$ was considered significant. The study underwent institutional Ethics committee analysis and was approved.

RESULTS AND DISCUSSION: In non-melanocytic lesions, there was a loss of RXR α in actinic keratosis and loss of both receptors in squamous cell carcinomas. These data favor the hypothesis that vitamin D would be important in the carcinogenic process in squamous lesions. In melanocytic lesions, we observed loss of both of the receptors in all lesions when comparing to control group. There was statistical correlation of the loss of the receptors and sun exposure, endorsed by the isolated analysis of the control group. There was also statistical correlation between nuclear VDR and histological regression, and also inverse correlation between RXR α and mitosis. These data endorse the hypothesis that sun exposure would be a main factor in the loss of protection mechanisms from VDR and RXR α and probably this loss occurs in the beginning of the development of melanocytic lesions, once there was not statistical difference between the analyzed lesions, despite of their malignance or benignancy. Finally, transcriptomic analysis confirmed the loss of VDR and RXR α in melanocytic lesions (intradermal nevi and melanoma) and demonstrated loss

of them in basal cell and squamous cells carcinomas. There was statistical difference to the most of analyzed mRNA comparing lesions to control, however, when we compare lesions between each other, basal cell carcinoma differentiated from squamous cell carcinoma but intradermal nevi not differentiated from melanoma. There was also low FOXO3, TP53 and XPC in melanomas.

CONCLUSION: VDR and RXR α expression was affected by sun exposure, and this mechanism could low vitamin D and RXR α protective effects. Immunohistochemistry analysis were endorsed by transcriptomic analysis, indicating an important role of VDR and RXR α in the squamous cell carcinogenesis. Considering melanocytic lesions, the loss of the receptors is not related to carcinogenesis, once there was no different presentation comparing benign and malign lesions. The comprehension of this physio pathogenic pathway opens opportunity to new researches and studies, making possible new insights to therapeutical strategies.

Keywords: Receptors, calcitriol; retinoid X receptor alpha; carcinoma, basal cell; carcinoma, squamous cell; melanoma

VDR – receptor de vitamina D

RXR α – receptor retinoide X, variante alfa

RXR in SK – receptor retinoide X alfa nos queratinócitos adjacentes

CBC – carcinoma basocelular

CEC– carcinoma espinocelular

QA = queratose actínica

NI= nevo intradérmico

ND = nevo displásico

MM = melanoma

SS = extensivo superficial (subtipo de melanoma)

AC = acral (subtipo de melanoma)

LM = lentigo maligno melanoma

ND = nodular (subtipo de melanoma)

UVA = radiação ultravioleta do tipo A

UVB = radiação ultravioleta do tipo B

RNA_m = ácido ribonucleico mensageiro

TE = tris EDTA

Sumário

Folha de rosto	2
Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	10
Lista de abreviaturas	14
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	15
1. Introdução	16
2. Referências bibliográficas	29
3. Objetivos	41
4. Materiais e Métodos	42
4.1. Descrição da amostra e tipo de estudo	42
4.2.1 Critérios de Inclusão	42
4.2.2 Critérios de Exclusão	42
4.3.1 Variáveis Clínicas	44
4.3.2 Variáveis Histopatológicas	45
4.4. Coleta dos dados	45
4.5. Processamento dos dados	46
4.5.1. Critérios histopatológicos	46
4.5.2. Técnica imuno-histoquímica	46
4.5.3. Análise imuno-histoquímica	48
4.6. Seleção de RNA mensageiro	49
4.7. Exame molecular em plataforma Nanostring® NCounter	52
5.0. Análise estatística	62
6.0. Aspectos éticos	62
CAPÍTULO II – Artigos científicos	63
Artigo 1.	64
Artigo 2.	71
Artigo 3.	96
CAPÍTULO III – Conclusão	128
Conclusão	129
Anexo 1	131
Anexo 2	135
Anexo 3	136

A radiação ultravioleta é a principal causa conhecida de lesões pré-neoplásicas e cânceres de pele. Muitos estudos associam a exposição à radiação ultravioleta com melanoma, contudo essa ação não é dose dependente, uma vez que a exposição contínua (em trabalhadores ao ar livre) foi associada a menos risco de melanoma do que episódios de queimadura e bronzeamento ao sol. (Field & Newton-Bishop., 2012; Slominski et al., 2017) Hipoteticamente, a queimadura solar leva a imunossupressão e perda dos mecanismos de reparo de dano ao DNA. (Wang et al. 1990; Jeevan et al. 1992; Field & Newton-Bishop., 2012)

A radiação UVA aparentemente é menos carcinogênica, porque gera oxidação de guanina no DNA, ao passo que a UVB gera dímeros de pirimidina e ciclobuteno, que são mais carcinogênicos, porém isso ainda é alvo de discussão. (Podgorska et al, 2021)

Vitamina D e metabolismo

A principal fonte de vitamina D, entretanto, é a exposição a UVB. (Field & Newton-Bishop., 2012; Slominski et al., 2017) Não há consenso sobre o nível ideal de vitamina D, já que este nível depende do fototipo, índice de massa corpórea, ingestão dietética, suplementação oral, latitude e genética. (Field & Newton-Bishop., 2012) Portanto, avaliar a ação da vitamina D através dos seus níveis séricos apresenta muitos vieses. Baixos níveis de vitamina D foram associados com pior prognóstico em melanoma. (Field & Newton-Bishop., 2012; Slominski et al., 2017) Um estudo prospectivo envolvendo 47800 homens com baixos níveis de vitamina D mostrou uma tendência maior de desenvolver

melanoma, entretanto, níveis altos não foram associados com proteção ao desenvolvimento da neoplasia. (Giovannucci et al., 2006)

A radiação ultravioleta do tipo B (UVB) com 260-320 nm de comprimento de onda transforma 7-deidrocolesterol em lumisterol, taquisterol e secosterol. Eles sofrem hidroxilação sistemicamente, no fígado e rins, resultando na forma ativa da vitamina D: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. (Slominski et al., 2020). Esta é a via clássica ou canônica, conforme demonstrado na figura 1.

Há uma outra via, alternativa, com formação de outros derivados da vitamina D: $20,23(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $20(\text{OH})\text{D}_3$. Estes produtos são detectados in vivo no plasma, epiderme e em adrenal. Eles inibem a proliferação de queratinócitos epidérmicos, melanócitos e fibroblastos dérmicos, e promovem a diferenciação de queratinócitos (Slominski et al., 2018) Eles também inibem as atividades fibróticas dos fibroblastos e têm propriedades imunomoduladoras. Diferentemente do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, eles não promovem aumento de cálcio em doses farmacológicas. (Slominski et al, 2018)

- VDR e RXR α são influenciados pela exposição solar.

Esta diminui a expressão dos receptores.

- Nas lesões de câncer de pele não melanoma, houve alteração significativa no carcinoma espinocelular, com perda dos dois receptores, e perda apenas do RXR α na lesão pré-maligna correspondente, a queratose actínica

- Ambos os receptores foram negativos nas lesões melanocíticas em relação ao controle, tanto na análise imunohistoquímica quanto molecular

- Nos melanomas houve correlação significativa entre VDR e regressão histológica. Houve correlação inversa entre RXR α e mitoses no melanoma.

- Na análise molecular, houve perda de VDR e RXR α em todas as lesões avaliadas, não-melanocíticas e melanocíticas. Quase todos os RNAm apresentaram relação de perda nas lesões com relação ao controle, exceto NCOR2 nas não-melanocíticas e RXR γ nas melanocíticas. Houve diferença estatística entre a maioria dos RNAm analisados comparando controle com as lesões.

- Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CBC e CEC com relação aos genes FOXO3, TP53 e MED1, com relação aos grupos NI e MM, houve diferença significativa apenas para o gene AhR.

- **A maior compreensão desta via fisiopatogênica abre oportunidade para novos estudos e pesquisas.**