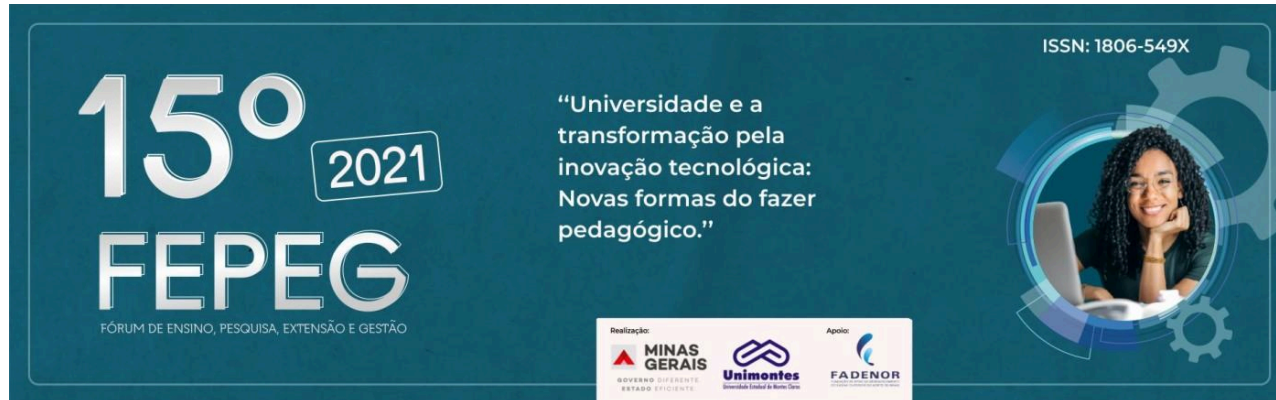




AUTOR(ES): DANIELLE FERREIRA ROCHA, SABRINA FERREIRA DE JESUS, SUELEN FERREIRA ROCHA, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARAES, YAN LUCAS MARTINS SILVA e ANA LAURA SILVEIRA LIMA.

ORIENTADOR(A): ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

EXPRESSÃO DO HIF1A NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL

Introdução

O carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna mais frequente na região de cabeça e pescoço, sendo que 90% dos tumores malignos da cavidade oral são oriundos de células escamosas. O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) representa um dos principais problemas de saúde pública em muitas partes do mundo, sendo o sexto tipo de câncer mais prevalente em homens no Brasil (ZHANG, 2015). Atualmente os fatores de risco mais descritos para a ocorrência do CCEB, é o consumo de álcool e tabaco, entretanto, fatores intrínsecos individuais, também estão relacionados no desenvolvimento e prognóstico do câncer (GUPTA; BAXI; HOYNE, 2017). Os tratamentos para o CCEB mais utilizados são a ressecção cirúrgica e a radioterapia, podendo ainda, estar associada à quimioterapia. Tais terapêuticas podem causar morbidades ao paciente, como déficits funcionais e danos estéticos significativos, incluindo deformidade da face, deficiência de fala e deglutição (WARNAKULASURIYA, 2009).

O fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF-1 α) é a principal proteína da via da hipóxia e induz a transcrição de vários genes alvos que promovem adaptações à hipóxia, os genes transcritos influenciam no metabolismo celular, na sobrevivência e migração das células, na regulação do pH e secreção de citocinas que induzem o fenômeno de angiogênese. Altos níveis de expressão de HIF-1 α estão associados a um pior prognóstico em câncer de mama, carcinoma do trato aerodigestivo superior e câncer colorretal. Além disso, estudos recentes identificaram funções essenciais de microRNAs em vários processos celulares, incluindo a carcinogênese (LANGHAMMER, 2011; PUISSEGUR, 2011).

Nesse sentido o presente estudo tem como objetivo identificar a expressão de HIF-1 α e miR-210 no carcinoma de células escamosas bucal.

Material e Métodos

A. Termos éticos

A aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e um termo de consentimento assinado pelos participantes da pesquisa foram obtidos (processo número CAAE 62425316.0.0000.5146).

B. Pacientes

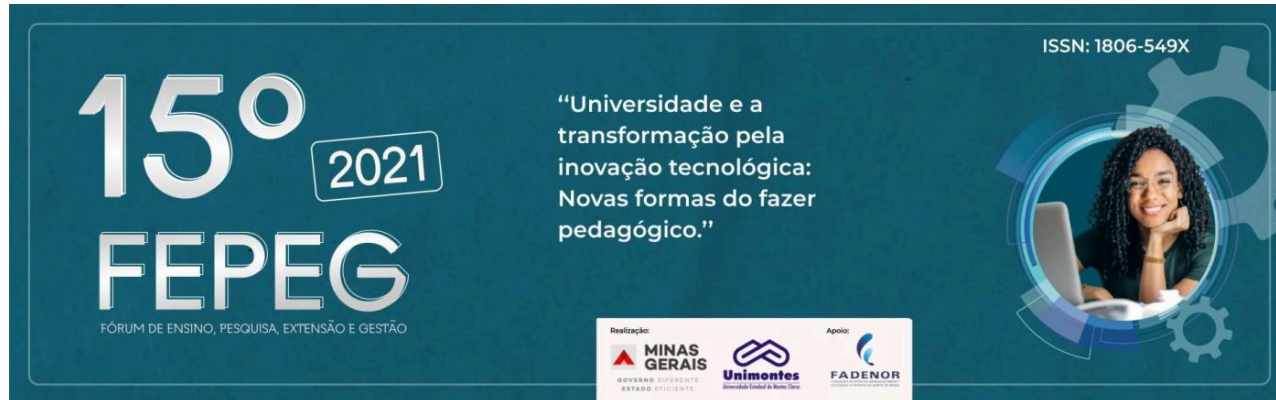
20 pacientes com e sem CCEB foram incluídos no estudo atual. O Grupo 1 foi composto por 10 Pacientes com CCEB sem nenhum tratamento de câncer e o Grupo 2 foi composto por 10 voluntários sem CCEB. O critério de inclusão para o grupo 1 foi a confirmação histopatológica do diagnóstico de CCEB de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde. Como critério de exclusão, todas as lesões com envolvimento labial foram excluídas. O critério de inclusão do Grupo 2, foi ausência de câncer bucal. Os critérios de exclusão foram, indivíduos que apresentassem história médica pregressa de câncer. Mais informações sobre os sujeitos estão dispostas na tabela 1.

C. Amostras de tecido

As amostras do grupo 1 foram 10 lesões primárias. As amostras do grupo 2 foram tecidos da mucosa oral coletados durante a cirurgia do terceiro molar. Para todos os grupos, amostras de tecidos de qRT-PCR que apresentaram menor expressão endógena ou curva de fusão incompatível também foram excluídas das análises.

D. Isolamento de RNA e qRT-PCR

O RNA foi isolado utilizando o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com o



fabricante. O RNA total foi tratado com DNase I, Grau de Amplificação (Invitrogen, número de cat 18068015, Carlsbad, CA, EUA) e, em seguida, 1,5 µg de RNA foi transcrito reversamente com o SuperScript® First-Strand Synthesis System para RT-PCR. Para qRT-PCR, 66 mg do cDNA foram adicionados ao reagente SYBER GREEN (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com HIF-1α. A amplificação foi realizada em um sistema StepOne QRT-PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Todas as reações foram feitas em triplicado. Beta-Actin foi usado como um controle endógeno para análise de expressão gênica. Os resultados foram quantificados como valores de Ct, em que Ct foi definido como o ciclo limite da PCR em que o produto amplificado é detectado pela primeira vez e definido como expressão relativa do gene (a razão de alvo / endógeno). qRT-PCR foi analisado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Para miR-210, um ensaio TaqMan foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. RNU44 foi usado como um controle endógeno para análise miR-210. Todas as reações foram feitas em triplicado. As seguintes etapas de reação foram utilizadas para a amplificação: 95 ° C por 10 min., 95 ° C por 15 seg. e 60 ° C por 1 min. Os valores Ct dos controles endógenos foram subtraídos dos valores Ct dos respectivos alvos para calcular o ΔCt . Os valores de ΔCt de cada grupo experimental foram calculados e convertidos para log de base 2 usando a eq. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para comparar a expressão entre diferentes amostras.

E. Análise Estatística

As análises foram realizadas usando SPSS (versão 18.0) e software GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os testes de Kolmogorov Smirnov e Shapiro-Wilk foram realizados para avaliar a distribuição dos dados. Após a definição da distribuição dos dados, foi realizado um teste apropriado. A significância estatística foi aceita em $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

A. HIF-1α apresentou níveis mais elevados em pacientes com CCEB

Para comparar os níveis de HIF-1α e miR-210 na lesão primária do CCEB e na mucosa oral, foi realizado o qRT-PCR. Como resultado, foi observado que o nível de HIF-1α estava aumentado em pacientes com lesão primária de CCEB em comparação a pacientes com a mucosa normal (Fig. 1A). Por outro lado, nenhuma diferença significativa nos níveis de miR-210 foi observada entre a lesão de CCEB e a mucosa normal (Fig. 1B).

No estudo atual, não foram observadas diferenças nos níveis de miR-210 entre o CCEB e a mucosa oral. Por outro lado, verificou-se que os pacientes com CCEB apresentaram níveis locais e sistêmicos mais elevados de HIF-1α em comparação ao grupo controle (pacientes sem CCEB). Além disso, foi demonstrado que o HIF-1α promove o desenvolvimento e metástase de CCEB e ainda, medeia adaptação à hipóxia por diminuir ativamente a regulação mitocondrial.

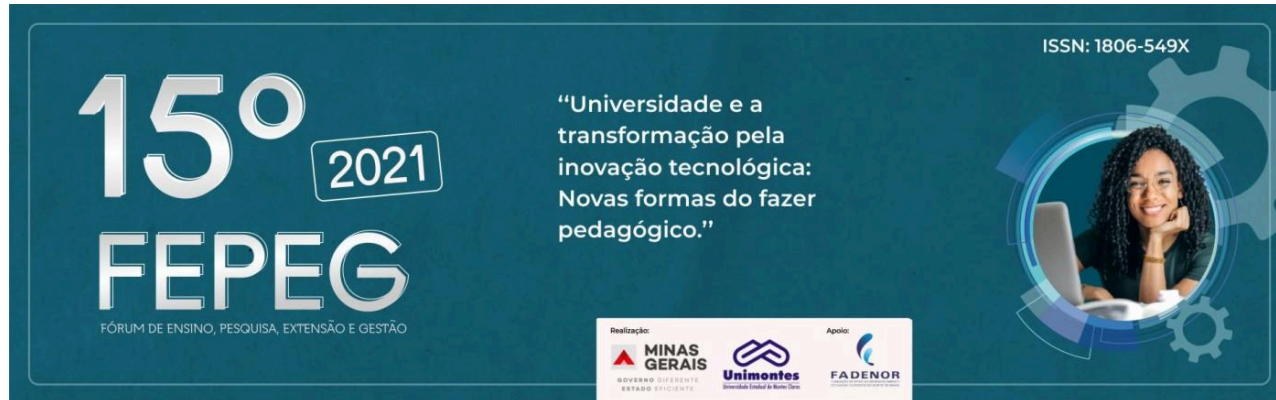
O carcinoma de células escamosas bucal é caracterizado por sua maior incidência em todo o mundo. Além disso, o desenvolvimento e tratamento de CCEB interferem diretamente na capacidade do paciente de falar, se alimentar, interagir socialmente, etc. (STELZLE, 2013). Assim, compreender totalmente as assinaturas moleculares do CCEB torna-se necessário para melhores resultados terapêuticos durante o seu tratamento e consequentemente o aumento da qualidade de vida dos pacientes.

Considerações finais

Em conclusão, é possível observar que o HIF-1α está diretamente associado ao carcinoma de células escamosas bucal, além de ser um fator que induz a hipóxia, aumentando a radiorresistência de células cancerosas. Logo, entender a expressão e função do HIF-1α, bem como os métodos que diminuam a expressão gênica dessa proteína são de grande importância no tratamento e prognóstico do CCEB.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), FAPEMIG (Fundação de Amparo à pesquisa de Estado de Minas



Gerais) e PIBIC/CNPq (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica) que contribuíram financeiramente com esse trabalho.

Referências

GUPTA, A.; BAXI, S.; HOYNE, C. Assessing feasibility, compliance and toxicity of concomitant chemo-radiotherapy in head and neck cancers in the Northern Territory: initial experience and challenges. **J Med Radiat Sci**, v. 64, n. 2, p. 131–137, 2017.

LANGHAMMER, S. *et al.* LDH-A influencia o fator 1alfa indutível por hipóxia (HIF1 alfa) e é crítico para o crescimento de células de carcinoma do cólon HT29 in vivo. **Target Oncol**, v. 6, n. 3, p. 155-162, 2011.

PUISSEGUR, M. P. *et al.* miR-210 é superexpresso em estágios tardios de câncer de pulmão e medeia alterações mitocondriais associadas à modulação da atividade do HIF-1. **Cell Death Differ**, v.18, n. 3, p. 465-478, 2011.

STELZLE, F. *et al.* Fatores que influenciam a inteligibilidade relativa da fala em pacientes com carcinoma de células escamosas oral: um prospecto estudo usando análise de fala automática, baseada em computador. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 42, n. 11, p. 1377–1384, 2013.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45 n. 4–5, p. 309–316, 2009.

ZHANG, S. *et al.* Guanchao Wang, et al. potential role of differentially expressed lncRNAs in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 10, p. 1581–1587, 2015

Tabela 1. Informações detalhadas sobre os sujeitos

Grupo	Tecido	Idade	Sexo	Uso de álcool	Fumar
CCEB	Lesão	57	Masculino	sim	sim
CCEB	Lesão	68	Masculino	sim	não
CCEB	Lesão	41	Feminino	não	não
CCEB	Lesão	72	Masculino	sim	não
CCEB	Lesão	54	Masculino	não	não
CCEB	Lesão	56	Masculino	sim	não
CCEB	Lesão	75	Masculino	sim	sim
CCEB	Lesão	48	Masculino	sim	sim
CCEB	Lesão	67	Masculino	não	não
CCEB	Lesão	47	Masculino	sim	sim
Controle	Mucosa	38	Feminino	não	não
Controle	Mucosa	19	Feminino	não	não
Controle	Mucosa	19	Feminino	não	não
Controle	Mucosa	22	Masculino	não	não
Controle	Mucosa	32	Feminino	não	não
Controle	Mucosa	24	Masculino	não	não
Controle	Mucosa	57	Masculino	não	não
Controle	Mucosa	29	Feminino	não	não
Controle	Mucosa	18	Masculino	não	não
Controle	Mucosa	56	Masculino	sim	sim

15° FEPEG

FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO

“Universidade e a transformação pela inovação tecnológica: Novas formas do fazer pedagógico.”

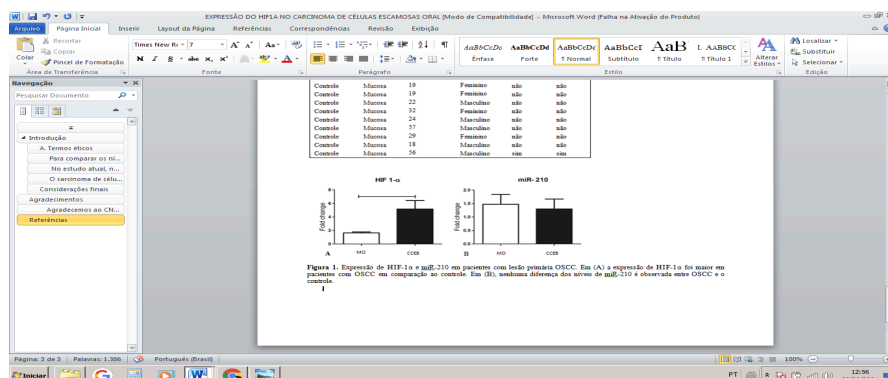


Figura 1. Expressão de HIF-1α e miR-210 em pacientes com lesão primária CCEB. Em (A) a expressão de HIF-1α foi maior em pacientes com CCEB em comparação ao controle. Em (B), nenhuma diferença dos níveis de miR-210 é observada entre CCEB e o controle.