



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

HIPÓXIA EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Autores: LORENA BARBOSA COSTA, CLÁUDIO MARCELO CARDOSO, SABRINA FERREIRA DE JESUS, MARCELA GONÇALVES DE SOUZA, ELOÁ MANGABEIRA SANTOS, LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

Hipóxia em Neoplasias de Glândulas Salivares

Introdução

Neoplasias das glândulas salivares (NGSs) são menos comuns que outros cânceres de cabeça e pescoço, incluindo Carcinoma de Células Escamosas de Boca e seu prognóstico está relacionado à localização anatômica da neoplasia (GUZZO M.; LOCATI L. D.; PROTT F. J., et al., 2010).

Recentemente, um grande número de estudos avaliou o papel da hipóxia no desenvolvimento e prognóstico do câncer (FRAGA C.A.; DE OLIVEIRA M. V.; DE OLIVEIRA E. S. et al., 2012). O Fator Indutível por Hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) demonstrou regular a expressão de vários miRNAs, incluindo o miR-210. Evidência recente sugere que o miR-210 desempenha um papel crucial na resposta celular à hipóxia. O HIF-1 α pode promover estabilização específica de isoformas miR-210 por ligação ao Elemento Responsivo à Hipóxia (HRE) presente no promotor proximal do miR-210 (CORN P. G., 2008). Semelhante ao HIF-1 α , a hipóxia induz a expressão do miR-210, que atua na regularização da proliferação celular, estabilidade do DNA, metabolismo das mitocôndrias, apoptose e angiogênese (DANG K.; MYERS K. A., 2015).

Embora o tratamento de primeira escolha para NGSs malignos seja a cirurgia (GREEN B.; RAHIMI S.; BRENNAN P.A., 2016), a terapia adjuvante tem sido historicamente determinada com base em dados de estudos em carcinomas de células escamosas do trato aerodigestivo superior (CERDA T.; SUN X. S.; VIGNOT S. et al., 2014). Estudos recentes demonstraram que a hipóxia pode promover uma aumento da radioresistência (HARADA H., 2016), especificamente via modulação mediada por miRNA a resposta hipóxica (GU H.; LIU M.; DING C.; et al., 2016). Tais dados sugerem o uso de quimiorradiação como opção alternativa de tratamento para pacientes que apresentam neoplasias radioresistentes (CERDA T.; SUN X. S.; VIGNOT S. et al., 2014). Considerando a controversa literatura sobre relação entre hipóxia e NGSs, o presente estudo teve como objetivo investigar os níveis de marcadores de hipóxia em neoplasias de glândula salivar benignas e malignas.

Material e métodos

A. Pacientes

A aprovação ética para este estudo foi obtida do Comitê de Revisão Institucional. Um total de 62 amostras foi incluído nas bases de dados do serviço de cirurgia de tumor glandular de 2010 a 2016. As amostras foram divididas em três grupos de acordo com a classificação de tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial de Saúde.

O grupo 1 (n = 16) foi constituído por tecido glandular sem neoplasia. As amostras foram obtidas a partir de excisões de mucocele. Os critérios de inclusão para este grupo foram a ausência de características neoplásicas e ausência de história de neoplasia durante as anamneses. O critério de exclusão foi qualquer informação colhida nas anamneses que sugere a presença de neoplasia.

O grupo 2 (n = 22) foi composto por pacientes com Adenoma Pleomórfico. O critério de inclusão foi presença de adenoma pleomórfico. O critério de exclusão foi características em anamneses que sugerem a presença de neoplasia.



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

O grupo 3 (n = 24) foi constituído por Carcinoma de Células Acinares n = 1, Adenocarcinoma não especificado n = 2, Carcinoma Adenoide cístico n = 9, Carcinoma Mucoepidermóide n = 10 e Carcinoma Mioepitelial = 2.

B. Imunohistoquímica

As reações imunohistoquímicas foram realizadas a partir de blocos de parafina de pacientes. Incluindo 13 controles (amostras normais de glândulas salivares), 16 tumores benignos (adenoma pleomórfico) e 20 neoplasias malignas (Carcinoma de Células Acinares n = 1; Adenocarcinoma modo não especificado n = 2; Adenóide carcinoma cístico n = 8; Carcinoma Mucoepidermóide n = 10 e Carcinoma mioepitelial = 2).

A expressão protéica do HIF-1 α foi avaliada através de Reações Imunohistoquímicas realizadas em cortes de 3,0 μ m de espessura. Os cortes foram desparafinizados com xileno e reidratados com álcool em soluções graduadas. A recuperação antigênica foi feita em uma temperatura de 121 °C durante 10 minutos em Tampão Trilogy (Trilogy, Cell Marque, CA, EUA).

Amostras de rim foram usadas como controles positivos. Controles negativos foram realizados substituindo o anticorpo primário por solução salina tamponada com fosfato (PBS). 10 campos microscópicos de parênquima tumoral foram fotografados para quantificar coloração no microscópio FSX100 (Olympus, Center Valley, PA, EUA). As células eram então contadas usando o software ImageJ (RUEDEN C. T.; SCHINDELIN J.; HINER M. C.; et al., 2017). A proporção de células positivas para o número total de células contadas foi utilizada para quantificar a coloração.

C. Isolamento de RNA e PCR em tempo real

O RNA foi isolado de células usando o reagente de Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. RNA total foi tratado com DNase I, Amplification Grau (Invitrogen, número de cat. 18068015, Carlsbad, CA, EUA).

O RNA foi transcrito de forma reversa com a SuperScript® First-Strand Synthesis Sistema para qRT-PCR (Invitrogen, número de cat. 11904018, Carlsbad, CA, EUA). Non-Template Control (NTC) foi incluído para cada ensaio. As condições de ciclagem térmica foram as seguintes: 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos das seguintes etapas: 95 °C 15 seg e 60 °C por 1 minuto.

Para o mir-210 (ID: Hs04231470_s1, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), o ensaio TaqMan foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. RNU44 foi usado como um controle endógeno para a análise mi-210 (ID: 001094, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Glândulas salivares normais foram utilizadas como grupo controle. Os seguintes passos reacionais foram usados para amplificação: 95 °C por 10 min, 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min.

Resultados e discussão

A. A maioria dos grupos apresentou coloração para o HIF-1 α ?

Análises qualitativas da expressão de HIF-1 α são apresentadas na Fig. 1A-H. A maioria dos grupos apresentou coloração para o HIF-1 α . A coloração não foi homogênea considerando os tipos histológicos. Análises quantitativas da expressão da proteína HIF-1 α e mRNA é apresentada na Fig. 2A e Fig. 2B, respectivamente. A expressão da proteína HIF-1 α não diferiu entre os grupos de caso e de controle ou entre NGSs benignos e malignos (Fig. 2A). Os níveis de mRNA do HIF-1 α e a expressão protéica também não diferiram entre os grupos caso e controle ou entre NGSs benignos e malignos (Fig. 2B).

B. O miR-210 é uma molécula essencial associada à hipóxia neoplásica

Similarmente ao HIF-1 α , os níveis de miR-210 foram semelhantes entre controles, malignos e NGSs benignos (Fig. 2C).



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Em conclusão, nossos dados sugerem que as neoplasias de glândulas salivares não aumentam os níveis de marcadores de hipóxia. Individualmente, os marcadores angiogênicos, mir210 e HIF-1 α não parecem correlacionar-se com malignidade das glândulas salivares.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado por subvenções do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo A Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr. Guimarães, Dr. Colleta, Dr. Santos e Dr. de Paula que são Pesquisadores do CNPq.

Referências bibliográficas

- GUZZO M.; LOCATI L. D.; PROTT F. J., et al. **Major and minor salivary gland tumors**. Critical reviews in oncology/hematology. 2010;74:134-148.
- FRAGA C.A.; DE OLIVEIRA M. V.; DE OLIVEIRA E. S. et al. **A high HIF-1 α expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients**. Oral oncology. 2012;48:130-135.
- CORN P. G. **Hypoxic regulation of miR-210: shrinking targets expand HIF-1 α 's influence**. Cancer biology & therapy. 2008;7:265-267.
- DANG K.; MYERS K. A.; **The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression**. International journal of molecular sciences. 2015;16:6353-6372.
- GREEN B.; RAHIMI S.; BRENNAN P.A. **Current management of the neck in salivary gland carcinomas**. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2016.
- CERDA T.; SUN X. S.; VIGNOT S. et al. **A rationale for chemoradiation (vs radiotherapy) in salivary gland cancers? On behalf of the REFCOR (French rare head and neck cancer network)**. Critical reviews in oncology/hematology. 2014;91:142-158.
- HARADA H. **Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance**. Journal of radiation research. 2016.
- GU H.; LIU M.; DING C.; et al. **Hypoxia-responsive miR-124 and miR-144 reduce hypoxia-induced autophagy and enhance radiosensitivity of prostate cancer cells via suppressing PIM1**. Cancer medicine. 2016;5:1174-1182.
- RUEDEN C. T.; SCHINDELIN J.; HINER M. C.; et al. **ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data**. BMC bioinformatics. 2017;18:529.

A aprovação ética para este estudo foi obtida do Comitê Institucional relevante. Conselho de Revisão (52767316600005146). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado

