



Autor(es): AMANDA MARIA RIBEIRO, LORENA DOS REIS PEREIRA QUEIROZ, ALFREDO MAURICIO BATISTA DE PAULA, ELOÁ MANGABEIRA SANTOS, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS, CLAUDIO MARCELO CARDOSO

Investigação de marcadores de hipóxia em neoplasias salivares benignas e malignas

Introdução

As Neoplasias de Glândulas Salivares (NGSs) são neoplasias agressivas que podem acometer a cabeça e/ou pescoço, mas possuem uma menor ocorrência de registros. Diversos estudos, recentemente, buscaram analisar a relação da hipóxia no prognóstico e desenvolvimento de câncer. Segundo Xiang *et al.* (2015), o Fator Indutor de Hipóxia 1-alfa (HIF-1a) é um marcador de hipóxia que é ativado em condições hipóxicas. De acordo com Lee *et al.* (2002), o HIF-1a regula a expressão de vários miRNAs (pequenos RNAs não codificantes), incluindo o miR-210. Índícios mostram que o miR-210 desenvolve um papel chave na resposta celular à hipóxia (HUANG; LE; GIACCIA, 2010). Como o HIF-1a, a hipóxia também induz a expressão do miR-210 (DANG; MYERS, 2015). Na literatura, há controvérsias sobre a relação da hipóxia com NGSs por isso, o presente estudo teve como finalidade pesquisar os níveis de mRNA de marcadores de hipóxia, tanto em neoplasias salivares benignas quanto nas malignas e também investigar, com bioinformática, os processos biológicos que são alterados no tratamento com quimioterapia em NGSs.

Material e Métodos

A. Pacientes

A aprovação ética para a presente pesquisa foi obtida através da Institutional Review Board (processo número CAAE 52767316.6.0000.5146). O consentimento dos pacientes, assinado, também foi obtido. As amostras da atual pesquisa consistem em 21 pacientes, do qual sete possuem neoplasias malignas (33,33%), sete neoplasias benignas (33,33%), e sete com glândulas salivares normais (33,33%).

B. Isolamento do RNA e PCR em tempo real

O RNA foi isolado seguindo o protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), utilizando Trizol. Todo o RNA foi tratado com a DNase I e 1,5µg de RNA foi transcrito inversamente com o SuperScript® First-Strand Synthesis System para qRT-PCR. Cada reação de base verde-SYBR para qRT-PCR (volume total de 20µl) continha 10 ml de SYBR Green Master Mix, 0,25 mL de ambos iniciadores (primers) diretos e inversos, 1µl de cDNA (66 ng/reação) e 8,5 ul de H₂O. Para o miR-210, um ensaio TaqMan foi feito seguindo o protocolo do fabricante. Como um controle endógeno do miR-210, foi usado um RNU44. Foram seguidos os seguintes passos reacionais para amplificação: 95°C durante dez minutos, 95°C durante 15s e 60°C durante um minuto.

C. Bioinformática e análise de redes de interação

Foram utilizados como produtos químicos: 5FU, bevacizumab, carboplatina, cisplatina, CPT11, ciclofosfamida, doxorubicina, gemcitabina, hidroxiureia, paclitaxel, pirarubicina, trastuzumab, e VP16. Todos os agentes quimioterápicos foram juntados em uma rede biológica no software de código aberto STITCH (versão 4.0). O STITCH foi utilizado para marcar as interações dos genes, para depois ser feito um mapa desses genes identificados.

Os principais alvos de agentes quimioterápicos usados para tratar de NGSs também foram usados para construir uma rede no software. Estes agentes são: P53, GAAD45, MDM2, ABL1, BAX, CASP3, CASP9, MLH1, MSH2, TOP2A, ERCC1, ERCC2, RRM1, TUBB2A, TOP2B, TOP2A e ERBB2.

Resultados e discussão

Indivíduos do grupo de controle tinham cerca de 28,3 anos de idade (57,1%), a maioria homem (Tabela 1). A amostragem do grupo de controle foi obtida por meio de mucosas orais presentes no lábio inferior. Nos tumores benignos, que foram adenomas pleomórficos, cerca de 14,3% estavam presentes nas glândulas salivares menores e seis (85,7) estavam presentes na glândula parótida. Os pacientes desta amostragem tinham cerca de 36,4 anos de idade. Quanto às neoplasias malignas, um paciente apresentou carcinoma acinar (14,3%), dois apresentaram carcinoma cístico (28,6%) e dois apresentaram carcinoma mioepitelial. Os pacientes desta amostragem tinham cerca de 52,3 anos de idade. Na amostragem de controle, não foi observada diferença na expressão do miR-210 (Fig.1A). Nas amostragens malignas e benignas, a expressão do miR-210 foi semelhante (Fig.1A). Os níveis de mRNA na HIF-1a não distinguiu-se entre as NGSs malignas e benignas, nem entre o grupo de controle (Fig.1B).

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

A análise das principais vias afetadas por agentes quimioterápicos foi realizada com o auxílio da bioinformática. O tratamento com Bevacizumab e Trastuzumab parecem não estar relacionadas em ponto e 16 proteínas aparecem na rede do software STITCH. Valores de R-quadrado e correlação foram 0.767 e 0.630, respectivamente. Análises ontológicas evidenciam que a reparação pós-replicação, a síntese de translesão propensa a erros, síntese de translesão e a síntese de translesão livre de erros são os processos mais afetados pelos fármacos quimioterápicos.

Outra análise bioinformática foi feita para avaliar os resultados do ponto e nessa análise observou-se que os principais processos biológicos para se correlacionar com a quimioterapia são: alongamento da fita de DNA, a replicação do DNA, resposta celular ao stress e a resposta celular a um estímulo.

Segundo Barker *et al.* (2015), devido ao fato de ações indiretas da radiação depender de oxigênio, estudos anteriores sugerem que a hipóxia é o principal mecanismo que contribui para a rádio resistência em cânceres específicos. NGSs são tradicionalmente consideradas rádio resistentes (CERDA *et al.*, 2014), porém, o mecanismo principal associado à rádio resistência de NGSs não está devidamente claro. Assim, as recomendações para o tratamento de NGSs malignas mudaram. O tratamento de NGSs é feito devido a uma melhoria de tecnologia de imagem e o desenvolvimento de várias opções de tratamento, como terapia de feixe de nêutrons e quimioterapia (LARAMORE *et al.* 1993).

De acordo com Wijffels *et al.* (2009), resultados sobre HIF-1a mostram que NGSs não são hipóxicas e sim que NGSs são muito bem oxigenadas, por isso é bem improvável que a hipóxia seja um fator relevante na progressão clínica desses tumores. Este estudo sugere que a HIF-1a não tem relação com a rádio resistência dos cânceres já que com o uso da bioinformática não foi observada alteração no processo de hipóxia em NGSs. Uma relação positiva também foi observada entre a hipóxia e o carcinoma cístico e os níveis de HIF-1a parecem não se alterar em adenomas pleomórficos quando se comparado com as amostras de controle (WANG *et al.* 2015).

Conclusões

Concluimos com nossa pesquisa que marcadores de hipóxia não exibem aumento em neoplasias de glândulas salivares. O HIF-1a e o miR-210, que são marcadores angiogênicos, não estão relacionados com a malignidade das neoplasias salivares. Este estudo sugere que não há diferença na expressão do miR-210 neste tipo de tumor. As análises de bioinformática sugerem que os processos biológicos relacionados com o reparo de DNA e divisão celular são os mais importantes em NGSs.

Agradecimentos

Este trabalho foi possível devido ao apoio dos órgãos de fomento FAPEMIG e CNPq.

Referências Bibliográficas

- XIANG, L. *et al.* HIF-1a and TAZ serve as reciprocal co-activators in human breast cancer cells. **Oncotarget**. v. 6, n. 14, p. 11768–11778, mai. 2015.
- LEE, Y. *et al.* MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **The EMBO journal**. v. 21, n. 17, p. 4663-70, set. 2002.
- HUANG, X.; LE, Q. T.; GIACCIA A. J. MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. **Trends in molecular medicine**. v. 16, n. 5, p. 230-7, mai. 2010.
- DANG, K.; MYERS, K. A. The Role of Hypoxia-Induced miR-210 in Cancer Progression. **International journal of molecular sciences**. v. 16, n. 3, p. 6353-72, mar. 2015.
- BARKER, H. E. *et al.* The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. **Nature reviews Cancer**. v. 15, n. 7, p. 409-25, jul. 2015.
- CERDA, T. *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**. v. 91, n. 2, p. 142-58, ago. 2014.
- LARAMORE, G. E. *et al.* Neutron versus photon irradiation for unresectable salivary gland tumors: final report of an RTOG-MRC randomized clinical trial. Radiation Therapy Oncology Group. Medical Research Council. **International journal of radiation oncology, biology, physics**. v. 27, n. 2, p. 235-40, set. 1993.
- WIJFFELS, K. I. *et al.* No detectable hypoxia in malignant salivary gland tumors: preliminary results. **International journal of radiation oncology, biology, physics**. v. 73, n. 5, p. 1319-25, abr. 2009.
- WANG, W. M. *et al.* Role of hypoxia-inducible factor-1a and CD146 in epidermal growth factor receptor-mediated angiogenesis in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Molecular medicine reports**. v. 12, n. 3, p. 3432-8, set. 2015.



Tabela 1. Dados descritivos da população de pacientes.

| Caso | Local Anatômico | Diagnóstico | Idade | Gênero |
|------------|------------------------|----------------------------------|-------|-----------|
| Controle 1 | Lábio | Mucocele | 20 | Feminino |
| Controle 2 | Lábio | Mucocele | 24 | Feminino |
| Controle 3 | Lábio | Mucocele | 53 | Masculino |
| Controle 4 | Lábio | Mucocele | 33 | Masculino |
| Controle 5 | Lábio | Mucocele | 8 | Masculino |
| Controle 6 | Lábio | Mucocele | 25 | Masculino |
| Controle 7 | Lábio | Mucocele | 35 | Masculino |
| Benigno 1 | Palato Duro | Adenoma Pleomórfico | 25 | Masculino |
| Benigno 2 | Parótida | Adenoma Pleomórfico | 20 | Feminino |
| Benigno 3 | Parótida | Adenoma Pleomórfico | 27 | Feminino |
| Benigno 4 | Parótida | Adenoma Pleomórfico | 32 | Masculino |
| Benigno 5 | Parótida | Adenoma Pleomórfico | 32 | Feminino |
| Benigno 6 | Parótida | Adenoma Pleomórfico | 52 | Masculino |
| Benigno 7 | Parótida | Adenoma Pleomórfico | 67 | Feminino |
| Maligno 1 | Parótida | Carcinoma de Células Acinares | 53 | Feminino |
| Maligno 2 | Parótida | Carcinoma Adenóide Cístico | 67 | Masculino |
| Maligno 3 | Glândula Submandibular | Carcinoma Adenóide Cístico | 54 | Feminino |
| Maligno 4 | Parótida | Carcinoma Mucoepidermoide | 11 | Feminino |
| Maligno 5 | Parótida | Carcinoma Mucoepidermoide | 58 | Masculino |
| Maligno 6 | Glândula Submandibular | Carcinoma Mioepitelial | 50 | Masculino |
| Maligno 7 | Glândula Submandibular | Carcinoma Mioepitelial | 73 | Masculino |

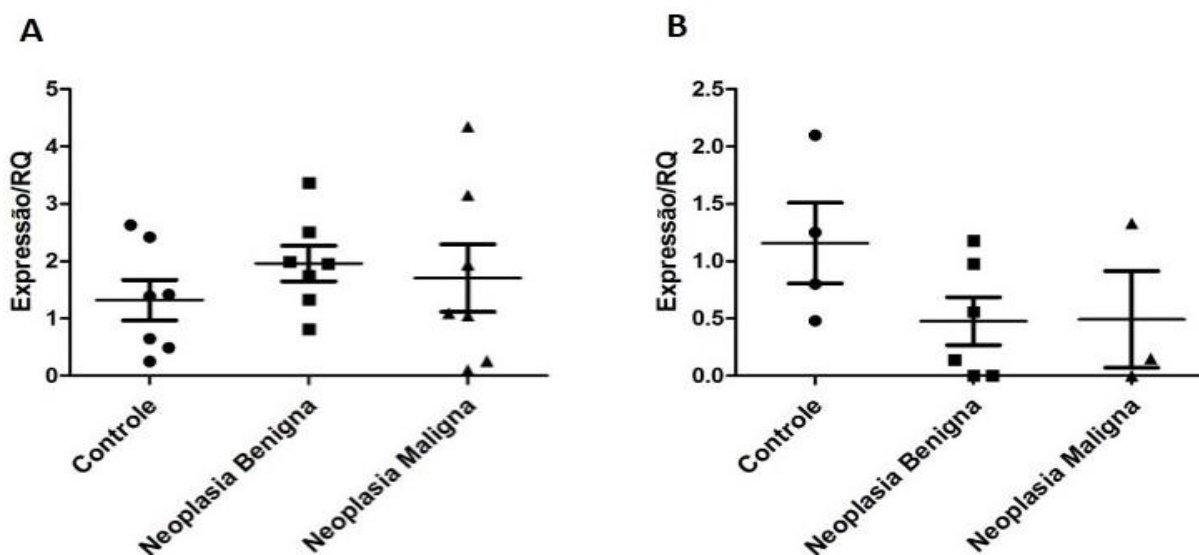


Figura 1. Níveis do mRNA miR-210 e de HIF-1a em NGSs malignas e benignas. (A) não se observa nenhuma diferença na expressão de miR -210 entre os grupos. (B) a expressão de HIF-1a não é alterada em NGSs em comparação com amostras do grupo de controle.