UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Avaliação em humanos da expressão da proteína HIF1-α em carcinoma epidermóide de boca: análise da sobrevida e características tumorais.

Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis

"Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, como exigência para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e avaliação obrigatória da disciplina Seminários de Graduação em Ciências Biológicas"
Orientador: Prof[a]. Dr[a]. Adriana Madeira Álvares da Silva

ALEGRE-ES
Novembro/2011

Demo mode

RESUMO

Introdução: O cacirnoma epidermóide possui comportamento agressivo é o tipo histológico correspondente em mais de 90% dos tumores de cabeça e pescoço. No Brasil a incidência é considerada uma das mais altas do mundo essa neoplasia é geralmente tratadas cirurgicamente, com radio e quimioterapia. A resposta à radio e quimioterapia depende da condição de vascularização tumoral, porém, estes tumores são geralmente hipóxicos, o que compromete a resposta ao tratamento. O principal mecanismo de resposta a condição de hipóxia é a ativação do sistema HIF, que resulta em aumento expressão de genes alvo com um papel importante na progressão do tumor, indução de vascularização e adaptação metabólica à hipóxia através do aumento do transporte de glicose por meio de atividade enzimática glicolítica. Vários estudos relacionam a expressão de HIF1-α ao prognóstico e desenvolvimento de vários tipos de tumores sendo, alvo de estudo das terapias moleculares. Objetivo: Avaliar a expressão da proteína HIF1-α em pacientes com carcinoma epidermóide de andar inferior da boca e correlacionar a características histopatológicas, sobrevida e progressão tumoral. Metodologia: a análise da expressão da proteína HIF1-α foi realizada por meio de observação microscópica da lâmina de *tissue microarray* imunomarcada com anticorpo específico para a proteína. Resultados: A expressão da proteína foi verificada em todas as amostras e a expressão fraca da foi associada com a característica histopatológica de desmoplasia (p=0,0089). Não houve relação entre a expressão da HIF1-α com a recidiva e status de sobrevida (p=0,6855; p=0,2911), resposta ao tratamento cirúrgico ou dos casos operados e irradiados (p=0,1944; p= 0, 5212), no entanto, os gráficos mostram que, apesar da insignificância estatística, os pacientes com expressão alta da HIF1-α viveram mais e recidivaram menos. Conclusão: houve expressão da proteína HIF1- α em todos os participantes do estudo e a expressão fraca foi mais frequente em relação à forte. Apesar de todos os indivíduos apresentarem expressão não houve significância estatística entre a relação da expressão com a recidiva local e status de sobrevida. Houve relação entre a desmoplasia e a expressão fraca da proteína HIF1-α característica relacionada ao pior prognóstico da doença e que devido a importância da via de sinalização e de outros interferentes bioquímicos, novos estudos com maior número de pacientes devam ser realizados.

Palavras-chave: carcinoma epidermóide, expressão, HIF1- α, cabeça e pescoço.

Demo mode

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA) o carcinoma de células escamosas (CCE) da boca, afeta lábios e o interior da cavidade oral, está entre as principais causas de óbito por neoplasias e representa uma causa importante de morbimortalidade, visto que mais de 50% dos casos são diagnosticados em estádios avançados da doença. Histologicamente tem inicio na camada epitelial superficial com o surgimento de células epiteliais malignas diferenciadas das células escamosas do epitélio normal com comportamento invasivo em direção ao tecido conjuntivo subjacente (NEVILLE, 2002).

Pessoas com maior risco de câncer bucal, com exceção de lábio, são homens com mais de 40 anos, com dentes fraturados, fumantes, etilistas e que usam próteses mal ajustadas (INCA,2010).

A incidência do câncer bucal no Brasil é considerada uma das mais altas do mundo, estando entre os cinco tipos de câncer mais comuns que acometem o sexo masculino e entre os sete mais comuns que atingem o sexo feminino.A estimativa dos casos de carcinoma epidermóide de boca para o ano de 2010, foi de 14.120 novos casos, sendo 10.330 em homens e 3.790 em mulheres. (INCA, 2010).

Em muitos países as das taxas de incidência e de mortalidade de tumores malignos, inclusive o CCE bucal, tem sido, de grande importância para o estabelecimento de diretrizes de políticas públicas em âmbito nacional, estadual e municipal e para o planejamento de ações de prevenção e controle do câncer, além de formas de tratamento ou assistência terapêutica (ARAUJO, 1998).

O prognóstico dos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é geralmente baseado na classificação clínica TNM, o qual avalia as características fundamentais de um câncer como a extensão local, disseminação regional e metástase à distância (COSTA et al., 2002).

O sistema TNM deve compreender detalhes das características anatômicas locais para que por meio desses dados se obtenham informações sobre o grau de envolvimento dessas estruturas pelo tumor, tal como metástases à distância, delineando o prognóstico e a sobrevida

Demo mode

do paciente (BAATENBURG et al., 2001). Contudo a utilização de outros marcadores é de suma importância, pois possibilita em conjunto estabelecer um plano de tratamento e estimar a sobrevida do paciente (O'SULLIVAN, SHAH, 2003).

1.2 Fatores de risco do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

Estudos comprovam que a etiologia dessa neoplasia é multifatorial e que dentre os fatores de risco para o carcinoma de boca, excluindo lábio que tem como principal fator de risco a exposição à luz solar, aqueles considerados extrínsecos, como as substâncias químicas presentes no tabaco e álcool, agentes físicos como traumas mecânicos causados por próteses mal ajustadas e os biológicos como infecção pelo papiloma vírus humano HPV. Entre os fatores intrínsecos estão, o estado sistêmico ou geral do indivíduo, além de fatores genéticos de suscetibilidade (NEVILLE et al., 1995; WÜNSCH e GATTÁS,2001).

A doença acomete principalmente indivíduos do sexo masculino e acima de 50 anos (NCI, 2007) e tem como principal fator de risco o tabagismo e o etilismo. Esses dois fatores são responsáveis pelo aumento do risco relativo da incidência do câncer bucal em até 140 vezes (INCA,2008). No entanto com a mudança no comportamento feminino, com maior exposição ao álcool e tabaco, houve também um aumento do CCE bucal nas mulheres, com conseqüente redução da razão de afetados homem: mulher que passou de 4,8:1 para 2,95:1 (AMORIM, 2003; CARVALHO, IKEDA, MAGRIN, 2004; BRENER et al., 2007).

O hábito de fumar e o consumo excessivo de bebida alcoólica apresentam efeito sinérgico, quanto maior for o número de doses de bebidas e cigarros consumidos maior será o risco do desenvolvimento da neoplasia (INCA,2010). A falta de higiene bucal pode agir sinergisticamente com o álcool, nessas condições, aumenta a produção de acetaldeído na saliva, um metabólito do etanol que contribui para o desenvolvimento do câncer (DÖBROSSY, 2005).

Existe ainda a associação entre aparecimento do tumor com a condição socioeconômica do paciente, essa associação pode ser explicada pela pobreza, alimentação deficiente e dificuldade de acesso ao serviço de saúde (FREEMAN, 2004; WARD et al.,2004).

Além desses fatores de risco, os HPV 16 e 18 são considerados de alto risco para o aparecimento da doença (FEMIANO, 2000). A membrana mucosa do epitélio da cavidade

Demo mode

oral e principalmente da orofaringe, possuem propensão para o desenvolvimento neoplásico decorrentes de efeitos da infecção pelo HPV (TINOCO et. al., 2004).

O diagnóstico do CCE, que pode ser realizado facilmente pela localização da neoplasia e é feito usualmente nas fases mais avançadas da doença (estádios III e IV), o que explica os maus resultados de sobrevida que atualmente é de aproximadamente 50% em cinco anos, independente do planejamento terapêutico adotado (INCA,2004).

Atualmente vários fatores determinantes na compreensão da etiologia e desenvolvimento do câncer têm sido investigados, possibilitando o conhecimento dos fatores de risco e prognóstico, importantes na prevenção efetiva da doença e no tratamento dos pacientes, entre eles vários fatores histopatológicos e moleculares.

Demo mode

1.3 Aspectos patológicos do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

O câncer de boca histologicamente inicia-se na camada epitelial superficial com o aparecimento de células epiteliais malignas, que se diferenciam das outras células escamosas do epitélio e possuem comportamento invasivo em direção ao tecido conjuntivo subjacente (NEVILLE, DAY, 2002). A língua, o lábio inferior e o assoalho bucal são os locais mais acometidos pelo carcinoma epidermóide oral. Essas regiões são grandes facilitadoras da disseminação dos carcinomas para linfonodos regionais e/ou órgãos distantes (ARAÚJO COSTA, RAMOS, 2006).

De acordo com a histopatológia tumores bem diferenciados mostram ninhos, colunas e cordões de células oriundas do epitélio pavimentoso; pleomorfismo celular e nucelar; hipercromatismo nuclear; mitoses atípicas em pequeno número; formação de pérolas de ceratina e invasão subepitelial. Uma resposta inflamatória significativa com linfócitos, plasmócitos e macrófagos também pode ser encontrada no carcinoma de células escamosas da boca (NEVILLE, 1998; REGEZI e SCIUBBA, 1991).

O carcinoma epidermóide da cavidade oral em estágios iniciais surge como placas firmes, elevadas, brancas, ou como áreas irregulares, ásperas ou verrucosas, podendo em ambos os casos, sobrepor-se a uma base de leucoplasia, eritroplasia, leucoeritroplásica ou possuir úlceras que freqüentemente não cicatrizam. O surgimento de massas exuberantes salientes ou ate mesmo necrose central, com superfície ulcerada, bordas elevadas e firmes

ocorrem de acordo com o crescimento dos tumores (EPSTEIN et al., 2008; NEVILLE, DAY, 2002).

Como a doença é de alta morbimortalidade, o diagnóstico precoce é importante e a busca de marcadores moleculares para a doença é objetivo de estudo de muitos grupos de pesquisa, pois a maioria dos pacientes tem doença avançada ao diagnóstico (estádio III e IV).A sobrevida tem relação inversa com o estádio avançado do tumor e está relacionada com a redução de 50% na expectativa de vida quando há presença de metástases linfáticas (MYERS, FAGAN, 1998; ZHEN et al., 2004).

Demo mode

1.4 Aspectos biomoleculares do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

De acordo com Ward (2002) diariamente, milhões de células dividem- se no organismo adulto normal, e, a cada divisão estamos expostos ao efeito de inúmeros carcinógenos ambientais.

Grande parte das alterações genéticas importantes no desenvolvimento do câncer ocorre em genes que controlam a proliferação celular (oncogenes e genes supressores de tumor), ou genes associados ao processo de reparo de danos no DNA, os quais, quando estão inativos, podem levar ao aumento das taxas de mutação, causando eventualmente a alteração de genes importantes na carcinogênese (OJOPI, NETO, 2002).

Após o aparecimento do câncer cada passo da progressão da doença é seguido por alterações cromossômicas resultantes tanto da perda como do ganho de material genético e, consequentemente perda ou ganho de função celular. Os resultados fenotípicos dessas alterações estão descritos em diferentes níveis do desenvolvimento do câncer: crescimento e supressão do tumor, angiogênese e invasão, potencial metastático, resposta imune. (AWADA, LALAMI, 2005).

Entretanto, o aparecimento e desenvolvimento de um clone de células tumorais é um evento relativamente raro, e isso se deve às inúmeras barreiras fisiológicas que a célula necessita romper para se tornar cancerígena. As barreiras primárias são os pontos de controle do próprio ciclo celular (WARD, 2002).

No carcinoma de cabeça e pescoço o desenvolvimento pode ocorre em múltiplas etapas, incluindo a perda de controle de ciclo celular, perda da capacidade de apoptose e reativação da telomerase. A perda da proteína Rb, a inativação de p27, a amplificação do

oncogene ciclina D1 além da p53 e p16 podem levar a progressão tumoral (CHOI, MEYERS, 2008; GLEICH, SALAMONE, 2002; RAYBAUD et al, 2003).

Em estudo realizado por Ruiz et al. (2006) indica que marcadores moleculares, tais como EGFR, CICLINA DL, FAS/FASL,proteína p27, VEGF, e metaloproteínases têm auxiliado no prognóstico de tumores de cabeça e pescoço. A busca por fatores prognósticos no CEC de cabeça e pescoço não é nova e, nem sempre, com êxito. Muitos fatores relacionados ao paciente e ao tumor já foram descritos.

O fator prognóstico ideal deveria suprir informações a respeito do comportamento biológico do tumor, a fim de prever sua evolução. Deveria ser facilmente analisado em fragmentos de biópsia para serem obtidas informações prognósticas antes do tratamento (YARDEN,2001).

Demo mode

1.5 Hipóxia e HIF1-α

Uma Grande parte das alterações genéticas nos genes que controlam a proliferação celular (oncogenes e genes supressores de tumor) são importantes no desenvolvimento do câncer ou ainda genes associados ao processo de reparo de danos no DNA, os quais, quando inativos, podem levar ao aumento das taxas de mutação, causando eventualmente a alteração de genes importantes na carcinogênese (OJOPI , DIAS-NETO,2002; MEHROTRA, YADAV, 2006).

A hipóxia é encontrada na maioria dos tumores sólidos devido às alterações estruturais e quantitativas nos vasos, levando a diminuição das concentrações de oxigênio (BRIZEL et al., 1999), entretanto o sistema de resposta a esta condição é essencial para progressão de tumores sólidos (MAXWELL, DACHS, GLEADLE, 1997; RYAN, POLONI, MCNULTY, 2000). O principal mecanismo de regulação para a homeostase do oxigênio celular e sistêmico é complexo transcricional *Hypoxia-inducible factor- 1* (HIF1) (STIEHL, WIRTHNER, KODITZ, 2006).

A HIF1-α é regulada no citoplasma pela proteína PHD3. As PHDs são dioxigenases Fe (II) - e 2-oxoglutarato-dependentes e suas atividades têm como requisito obrigatório di-oxigênio como co-substrato, possuem um núcleo catalítico contendo ferro e perdem a atividade na presença de níquel (SEMENZA, 2003; CHEN, COSTA, 2009).

Ligado ao DNA genômico, o complexo HIF1, composto por uma subunidade -alpha e uma subunidade -beta também conhecida como *aryl hydrocarbon receptor nuclear*

translocator (ARNT), pode promover a transcrição de mais de 60 genes que atuam em mecanismos específicos para evitar a morte celular causada pela hipóxia. Por sua vez, as proteínas produzidas aumentam as concentrações de oxigênio através da angiogênese, além de enzimas do transporte de glicose e metabolismo (HUANG, BUNN, 2003).

A subunidade HIF1-beta é expressa constantemente e seu mRNA e proteína são mantidos em níveis constantes independente das condições de oxigênio. Por outro lado, a proteína HIF1-α tem uma meia vida curta (~5 minutos) e é regulada de acordo com o teor de oxigênio (SALCEDA, CARO, 1999), sob condições de normóxia, a HIF1-α é rapidamente degradada. (WANG,JIANG, RUE, 1995). E a degradação é regulada por modificações pós-traducionais, como a hidroxilação, acetilação e ubiquitinação (LANDO, PEET, GORMAN, 2002; BRAHIMI-HORN, MAZYRE, POUYSSEGUR 2005).

Um importante domínio presente na subunidade HIF1-alpha é o Oxygen-regulated degradation (ODD – Degradação regulada por oxigênio) que de acordo com a disponibilidade de oxigêmio media a estabilidade da subunidade HIF1-α (PUGH, O'ROURKE, NAGAO, 1997). A degradação da HIF1-α é regulada por modificações pós-traducionais, como a hidroxilação, acetilação e ubiquitinação do domínio ODD, por isso sob condições de normóxia, a HIF1-α é rapidamente degradada quando detectada (WANG, JIANG, RUE, 1995).

Em condições de normoxia em seu domínio ODD a HIF1-alpha é rapidamente hidroxilada pela proteína Prolyl Hydroxylation (PHD) e posteriormente a proteína von Hippel-Lindau (pVHL) reconhece a hidroxilação adicionando ubiquitina, marcando-a para a degradação proteossomal (SALCEDA, CARO, 1999; MASSON, APPERLHOFF, TUCKERMAN, 2004).

Em condições de hipóxia é formado o complexo HIF1 trascripcionalmente ativo no qual a subunidade HIF1-α é estabilizada e translocada do citoplasma para o núcleo, onde dimeriza com a subunidade HIF1-beta (HUANG, ARANY, LIVINGSTON, 1996; KALLIO, PONGRATZ, GRADIN, 1997; SEMENZA, 2003).

A ativação do sistema HIF1 é um passo importante no desenvolvimento e progressão tumoral sob as condições de hipóxia, esse sistema ativa as vias de angiogênese e sobrevivência levando o tumor ao escape da morte por hipóxia. (WANG, JIANG, RUE, 1995; RATCLIFFE, PUGH, MAXWELL, 2000; FILLIES, WERKMEISTER, DIEST, 2005). São resultados da angiogênese o aumento da densidade vascular, a permeabilidade tecidual e, consequente diminuição da distância para a difusão do oxigênio.

Demo mode

Segundo Silva et al. (2007) a proteína HIF1-α como marcador de hipóxia pode auxiliar na estratificação dos pacientes em categorias, qualificando e facilitando identificar a modalidade terapêutica mais adequada, assim como predizer o prognóstico com maior precisão.

Os estudos mais recentes apontam para o gene HIF1-α como candidato à terapia celular no tratamento do câncer. (SEMENZA, 2003; KOH, SPIVAK-KROIZMAN, POWIS, 2010).

Demo mode

2. OBJETIVO

2.1 Geral:

Verificar a expressão da proteína HIF1-α em tumores de andar inferior de boca e associar com características clínicas, histopatológicas e agressividade tumoral.

2.2 Específicos:

Avaliar a expressão da proteína HIF1-α por imunoistoquímica e relacionar com o tratamento e a sobrevida dos pacientes com tumores de andar inferior de boca.

Avaliar a relação da expressão da proteína HIF1-α com o TNM e características histopatológicas de tumores de andar inferior de boca.

Demo mode

6. CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados chegamos às seguintes conclusões:

- Houve expressão da proteína HIF1- α em todos os participantes do estudo.
- A expressão fraca da proteína HIF1-α foi mais frequente em relação à forte.
- Quanto às carcterísticas histopatológicas não houve relação entre a expressão da proteína e as variáveis linfonodo acometido, tamanho do tumor, invasão perineural, infiltrado inflamatório e necrose.
- Houve relação entre a desmoplasia e a expressão fraca da proteína HIF1-α.

Demo mode