

## O EFEITO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA EXPRESSÃO DE HIF-1? E MIR-210 SOB HIPÓXIA EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

**Autores:** SUELI NUNES FONSECA, SABRINA FERREIRA DE JESUS, MARCELA GONÇALVES DE SOUZA, LÍLIAN MENDE BORBUREMA CANGUSSU, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, AMANDA MARIA RIBEIRO, LORENAS DOS REIS PERREIRA QUEIROZ, , , ,

### Introdução

O câncer é uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com cerca de 8 milhões de mortes e 14 milhões de novos casos relatados em 2012, resultando em um grande problema de saúde pública. O carcinoma de células escamosas de Boca (CCEB) é o tipo mais comum de malignidade oral, é considerado um grande problema de saúde pública (Ferlay, *et al.* 2015 *et al.*). O consumo de álcool e tabagismo são fatores predisponentes mais importantes atualmente descritos. Estes dois fatores têm um efeito sinérgico (Gupta 2016 *et al.*). A principal proteína da via hipóxia é HIF-1?, que é um fator de transcrição que visa vários genes que promovem adaptações em condições de hipóxias e tem sido amplamente estudado. Os níveis elevados de expressão desta proteína estão associados a um pior prognóstico em diferentes tipos de câncer (Fraga CA, Hoffmann, Aebbersold 2016 *et al.*). HIF-1 ? visa genes envolvidos na resistência a medicamentos e processos como o metabolismo da matriz extracelular e adesão celular, levando a invasão e metástase. No entanto, o mecanismo exato que liga HIF-1a esses processos ainda não foi elucidado (Yang X, Zhao 2014 *et al.*). Considerando os conflitos na literatura sobre a relação entre radiações ionizantes e marcadores hipóxicos, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da radiação na expressão de HIF-1? e miR-210 no Carcinoma de células escamosas de boca sobre condições de hipóxia.

### Material e Métodos

#### A. Pacientes

A aprovação ética para este estudo foi obtida junto do Conselho de Revisão Institucional (número do processo CAAE 52760016.9.0000.5146). Os pacientes foram selecionados a partir de um Biobanco (Registro CONEP:B-013; Parecer nº. 008/2013) com diagnóstico histológico de Carcinoma de células escamosas de Boca (CCEB) e foram submetidos ao termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O estudo utilizou dez amostras de tecidos de lesão primária de pacientes com CCEB sem o tratamento radioterápico e dez amostras de mucosa normal como controle.

#### B. Cultura celular e hipóxia

As células SCC9 (ATCC CRL-1629) foram mantidas no meio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM / F12, GIBCO, Billings, MT, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, GIBCO, Billings, MT, EUA), 400 mg / ml de hidrocortisona e solução antibiótica a 37 ° C com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera de ar humidificado. Para simular condições de hipóxia, as células SCC9 foram cultivadas em meio com a adição de 100 ?M de cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>, Sigma, St. Louis, MO, EUA) durante um período de 24 horas.

#### C. Ensaio e grupos de radiação

A radiação foi utilizado neste estudo, com isso as células foram irradiadas usando técnica isocêntrica com o acelerador linear posicionado na base da célula aderida. As células foram irradiadas com doses de 6 Gy. O efeito da radiação em células SCC9 foi avaliado em todos os ensaios após 24 horas de radiação. As comparações estavam entre os quatro grupos, que incluíam controle, CoCl<sub>2</sub>, Radiação e CoCl<sub>2</sub> + Radiação.

#### D. Isolamento de RNA e qRT-PCR

O RNA foi isolado usando o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com o fabricante. Foram avaliadas os níveis de expressão de RNAm dos marcadores HIF-1? e de miR-210, através da técnica de qRT-PCR.

#### E. Análise estatística

As análises foram realizadas usando o software SPSS (Versão 18.0) e GraphPad Prism (Versão 5.0, GraphPad Software). Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram realizados para avaliar a distribuição de dados. À medida que as amostras apresentadas como uma distribuição normal, a ANOVA unidirecional, seguida do teste pós-teste de Tukey, foi conduzida. O significado estatístico foi aceito em p < 0,05.

### Resultados e discussão

A expressão de RNAm de HIF-1? foi maior em amostras de lesão primária de CCEB em comparação com a mucosa normal (Figura 1A). Níveis semelhantes de miR-210 foram observados em pacientes com CCEB em comparação com a mucosa normal (Figura 1B).



Os polimorfismos G1790A e C1772T do gene HIF-1 $\alpha$  estão associados a uma expressão aumentada da proteína HIF-1 $\alpha$ , sugerindo associação com um pior prognóstico em pacientes com carcinoma do trato aero digestivo superior. HIF-1 $\alpha$  foi expresso em pacientes com câncer de células escamosas orofaríngeas e o grau de expressão tem valor preditivo e valor prognóstico em indivíduos submetidos a terapia de radiação (Aebersold 2001 *et al.*). Uma vez que a hipóxia é um fator que aumenta a expressão de HIF-1 $\alpha$ , avaliamos o papel da radiação ionizante na expressão de HIF-1 $\alpha$  e miR-210 em células escamosas orais sob hipóxia. Nossos resultados mostram que a radiação na condição de hipóxia não promoveu diminuição nos níveis de RNAm de HIF-1 $\alpha$  e miR-210 (Figura 2 A, B). Os MicroRNAs são promissores como biomarcadores estáveis em ambos os tecidos e sangue, possuem a capacidade de atuar como reguladores da expressão do gene que permite influenciar as vias de sinalização. Assim, pode modificar vários processos celulares envolvidos na resposta à irradiação. Embora a hipóxia tenha sido geralmente reconhecida pelo seu impacto no metabolismo da glicose, certos tumores hipóxicos demonstram aumentos significativo na absorção de glicose e na produção de lactato (Rajendran 2004 *et al.*).

## Conclusão

Este estudo demonstrou que a radiação sob condição de hipóxia não interferiu nos níveis de RNAm nos marcadores hipóxicos HIF-1 $\alpha$  e miR-210. Assim, são necessárias mais investigações para elucidar as vias moleculares envolvidas na resistência das células de carcinoma escamosas orais expostas ao ambiente de radiação ionizante e hipóxia.

## Agradecimentos

Este trabalho foi possível devido ao apoio por doações do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e (CAPES).

## Referências:

- FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015 Mar 01;136(5):E359-86.
- GUPTA A, BAXI S, *et al.* Assessing feasibility, compliance and toxicity of concomitant chemo-radiotherapy in head and neck cancers in the Northern Territory: initial experience and challenges. *Journal of medical radiation sciences*. 2016 Jul 01.
- FRAGA CA, DE OLIVEIRA MV, *et al.* A high HIF-1 $\alpha$  expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral oncology*. 2012 Feb;48(2):130-5.
- HOFFMANN AC, MORI R, *et al.* High expression of heparanase is significantly associated with dedifferentiation and lymph node metastasis in patients with pancreatic ductal adenocarcinomas and correlated to PDGFA and via HIF1 $\alpha$  to HB-EGF and bFGF. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2008 Oct;12(10):1674-81; discussion 81-2.
- AEBERSOLD DM, BURRI P, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer research*. 2001 Apr 01;61(7):2911-6.
- YANG X, ZHU H, *et al.* Melittin enhances radiosensitivity of hypoxic head and neck squamous cell carcinoma by suppressing HIF-1 $\alpha$ . *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014 Oct;35(10):10443-8.
- RAJENDRAN JG, MANKOFF DA, *et al.* Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clinical cancer research*. 2004 Apr 01;10(7):2245-52. *research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.

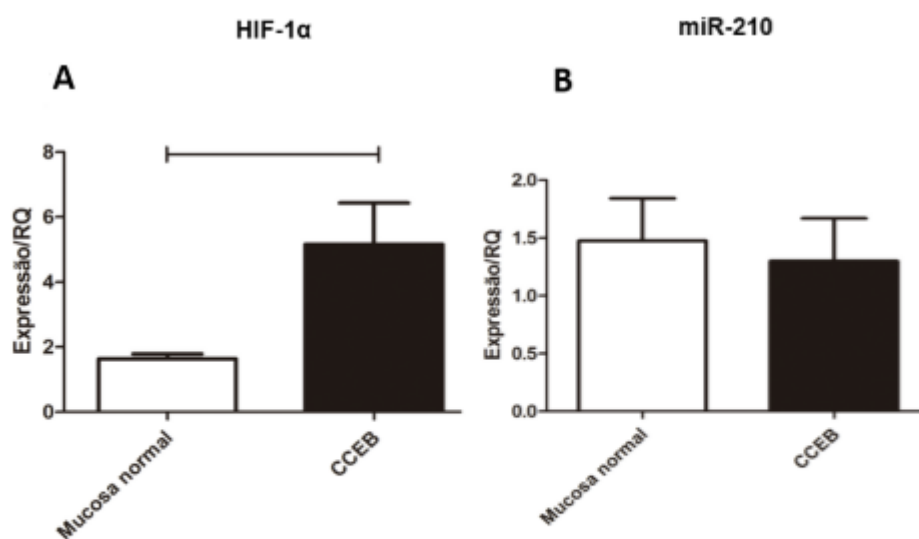
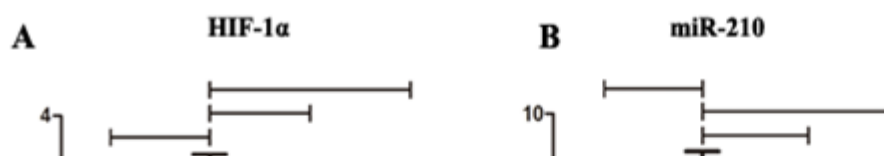


Figura 1: Expressão de HIF-1 $\alpha$  e miR-210 em lesão primária dos pacientes com CCEB e controle (Mucosa Normal)



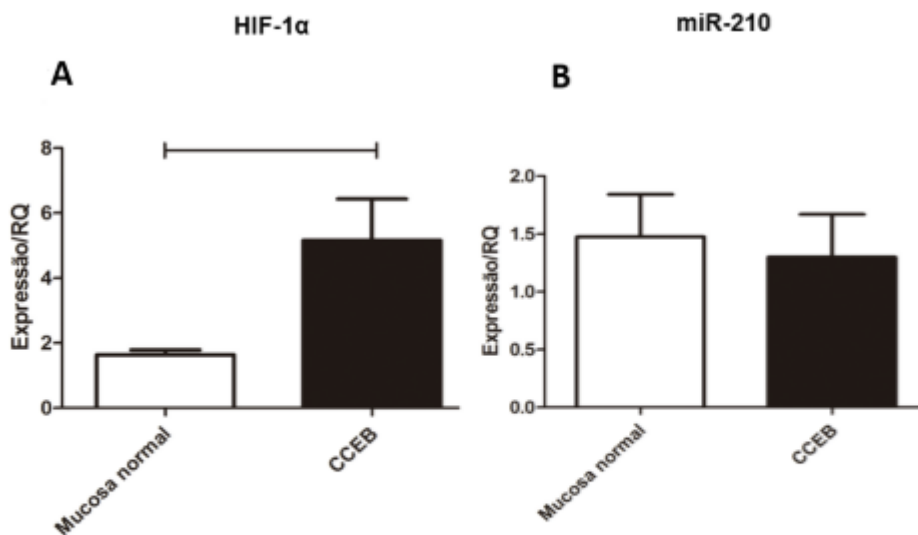


Figura 1: Expressão de HIF-1 $\alpha$  e miR-210 em lesão primária dos pacientes com CCEB e controle (Mucosa Normal)

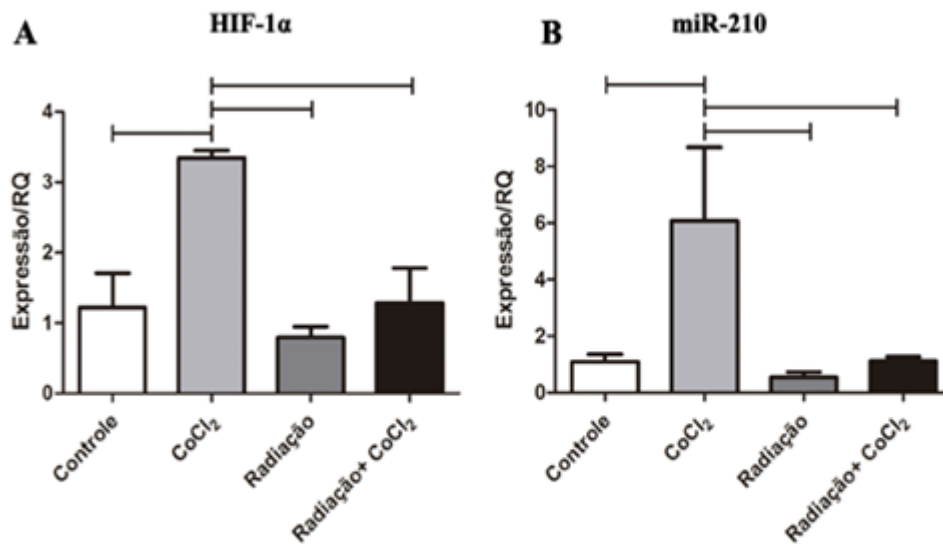


Figura 2: Expressão de HIF-1 $\alpha$  e miR-210 sobre o efeito da radiação em condições hipóxicas nas células SCC9