



Estudo das variantes polimórficas G1790A e C1772T do gene HIF-1 α

Carlos Ícaro de Jesus Silva, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Sabrina Ferreira de Jesus, Lucyana Conceição Farias, Patrícia Luciana Batista Domingos, Alfredo Maurício Batista de Paula, Andre Luíz Sena Guimarães

Introdução

O carcinoma de células escamosas (CCE) é a neoplasia maligna mais comum na cavidade bucal, representando aproximadamente 90% dos tumores malignos da boca. O CCE de boca (CCEB) é considerado agressivo por estar associado a uma acentuada morbidade e alta taxa de mortalidade, com uma sobrevida menor que 50% em longo prazo. A incidência de CCE aumenta com a idade, sendo maior após os 40 anos de idade, mais comum no sexo masculino [1]. A carcinogênese bucal é um processo multifatorial, caracterizado por alterações genéticas, epigenéticas e fenotípicas [2, 3]. Muitas dessas alterações envolvem a ativação de vias de sinalização metabólicas que favorecem o crescimento celular e as características de sobrevida da célula [4]. Considerando os fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço, estudos mostram que indivíduos tabagistas apresentam um risco aumentado para a doença; o etilismo exerce um efeito sinérgico, exacerbando, assim, o risco para o desenvolvimento do câncer [5]. Em mamíferos, o complexo transcricional fator induzido por hipóxia (HIF) é a chave reguladora das respostas locais e sistêmicas à hipóxia que ocorrem durante os processos normais e patofisiológicos [6]. Células do tecido tumoral adaptam-se a ambientes de hipóxia via conversão do metabolismo energético glicolítico, indução de angiogênese e outras vias de manutenção celular [7]. HIF é um complexo protéico heterodimérico composto pelas subunidades α e β . Um polimorfismo na região promotora pode alterar a proporção da transcrição de uma determinada proteína. Já, quando localizado na região codificadora ou nos limites intron/éxon, pode produzir proteínas incompletas ou inativas, como resultado de um processamento incorreto no RNA mensageiro (mRNA). Polimorfismos genéticos caracterizados por completas deleções gênicas eliminam qualquer atividade funcional da proteína [8]. Polimorfismos de nucleotídeos únicos representam uma das formas mais comuns de variações genéticas humanas. Os polimorfismos C1772T e G1790A podem afetar a função do HIF independente das condições de oxigênio celular. O objetivo deste estudo foi avaliar se o polimorfismo C1772T e G1790A do HIF-1 α estão associados com probabilidade de desenvolvimento do CCEB.

Material e métodos

Trata-se de um estudo retrospectivo. O estudo envolveu a análise dos polimorfismos do gene HIF-1 α (C1772T e G1790A). Foram analisados 48 indivíduos com leucoplasia oral caracterizados, histologicamente, com quadro de displasia epitelial (DE), 40 indivíduos com CCEB e 88 indivíduos controles (livres de DE e CCEB na mucosa bucal). Os indivíduos foram recrutados do Banco de dados de câncer de cabeça e pescoço-Montes Claros/MG, vinculado ao Laboratório de Pesquisa em Saúde da UNIMONTES. Descrição física da cor da pele não foi utilizada, uma vez que, no Brasil, é um preditor pobre de ancestralidade genômica. Para o estudo dos polimorfismos, o DNA das amostras foi extraído, utilizando o *kit DNeasy* (Qiagen, Chatsworth, CA). Em seguida, foram realizadas reações de amplificação do DNA através da técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando, para isso, *primers* específicos, que flanqueiam a região em que os sítios polimórficos encontram-se localizados. Para a identificação das variantes genotípicas, utilizou-se a técnica PCR-RFLP. Nessa técnica, os produtos de PCR são submetidos à digestão com enzimas de restrição específicas capazes de clivar os sítios de restrição, sendo que o polimorfismo C1772T foi utilizada a enzima de restrição HphI, e para o G1790A, a enzima AclI. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* estatístico SPSS®, versão 13.0 para Windows®.

Resultados



FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:



APOIO:



FAPEMIG



FADENOR

24 a 27 setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

Características clínico-patológicas do grupo de estudo são apresentados na Tabela 1. A idade média entre o grupo controle, DE e CCEB foi $71,74 \pm 7,67$, $45,0 \pm 6,52$ e $62,10 \pm 13,99$ anos, respectivamente. A frequência do alelos T e alelos A foi maior em pacientes com DE e CCEB, quando comparado com o grupo controle (Tabela 2). Genótipos TT e AA estavam aumentados em pacientes com CCEB, quando comparados com o grupo DE. Além disso, o genótipo CT foi associado com moderada displasia epitelial, enquanto o genótipo TT foi mais frequente no CCEB (Tabela 2).

Discussão

Carcinogênese oral é um processo patológico, cujos mecanismos subjacentes ainda não estão muito bem esclarecidos [9]. Estudos sobre cancerização têm demonstrado que alterações genéticas e epigenéticas podem estar associadas com um maior risco de desenvolvimento de câncer de boca. Os polimorfismos C1772T e G1790A, localizados no éxon 12 do gene HIF-1 α , foram associados com o aumento da transcrição e aumento dos níveis de HIF-1 α , o que influenciou a progressão da doença. Altos níveis da proteína HIF-1 α nos linfonodos podem regular alguns fatores segregados por tumores primários, que pode alterar o microambiente tumoral e favorecer o estabelecimento de metástase em linfonodos. Além disso, o polimorfismo G1790A, juntamente com a expressão da proteína HIF-1 α , pode ter um impacto negativo no prognóstico de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Foi observado que as frequências dos genótipos TT, GA e AA foram maiores nos casos de DE em mucosa bucal, quando comparados com o grupo controle. No entanto, quando comparou-se o CCEB e os pacientes DE, os primeiros apresentaram aumento na frequência genotípica TT e AA. Isto sugere que a presença de genótipos TT e AA pode aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento da neoplasia em boca. Há evidências que sugerem que a ativação do HIF-1 ocorre nos estágios iniciais da carcinogênese. A deleção do MMP-9 em um modelo com camundongos suprimiu a progressão de tumor devido à inibição da mobilização do VEGF da matriz extracelular. Nos primeiros estágios de desenvolvimento do câncer, a expressão de matriz de metaloproteinase (MMP) favorece o desenvolvimento de lesões potencialmente cancerizáveis, e a expressão de MMP, fator de crescimento epitelial (EGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) está associada à progressão da malignização. Estes resultados, em conjunto com estudos anteriores sugerem que, HIF-1 α tem um papel importante nos estágios iniciais do câncer bucal. Além disso, sugerimos que os polimorfismos do HIF-1 α podem alterar a proteína HIF-1 α e, simultaneamente, aumentar a expressão de seus genes-alvo, na displasia epitelial e carcinomas da cavidade oral.

Conclusão

O estudo demonstrou que os alelos T e A do polimorfismo C1772T e G1790A do gene HIF-1 α aumentou o risco de DE e CCEB. O polimorfismo C1772T e G1790A do gene HIF-1 α apresentou diferentes padrões de desequilíbrio alélico nas lesões potencialmente cancerizáveis e CCEB, sugerindo um padrão genético complexo de progressão da displasia para carcinoma. Estes resultados sugerem um adicional papel para o HIF-1 α no desenvolvimento de CCEB. Mais estudos são necessários para elucidar a via do HIF-1 α na carcinogênese, o que pode vir a contribuir com o entendimento da carcinogênese de boca e com o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico do CCEB.

Referências

- [1] Scully C, Porter S: Oral cancer. *West J Med* 2001;174(5):348-351.
- [2] Esteller M: The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006;27(6):1121-1125.
- [3] Mehrotra R, Yadav S: Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian JCancer* 2006, 43(2):60-66.
- [4] Akrish S, Buchner A, Dayan D: Oral cancer: diagnostic options as an aid to histology in order to predict patients at high risk for malignant transformation. *RefuatHapehVehashinayim* 2004;21(4):6-15.
- [5] Wu RQ, Zhao XF, Wang ZY, Zhou M, Chen QM: Novel molecular events in oral carcinogenesis via integrative approaches. *J Dent Res* 2011, 90(5):561-572.
- [6] Semenza GL: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *NatRevCancer* 2003;3(10):721-732.
- [7] Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM: Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441(7092):437-443.
- [8] Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *The American journal of medicine*. 1980;69(4):491-7.
- [9] Fraga CA, Oliveira MV, Domingos PL, Botelho AC, Guimaraes AL, Teixeira-Carvalho A, et al. Infiltrating CD57+ inflammatory cells in head and neck squamous cell carcinoma: clinicopathological analysis and prognostic significance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(3):285-90



Tabela 1. Características sócio-demográficas e clínico-patológicas dos grupos estudados

Parâmetros	Controle n (%)	Displasia Epitelial n(%)	CCEB* n(%)
Uso de Álcool			
Não	61 (69.3)	14 (22.9)	18 (45.0)
Sim	27 (30.7)	44 (77.1)	22(55.0)
Uso de Tabaco			
Não	62 (70.5)	11 (22.9)	13 (32.5)
Sim	26 (29.5)	37 (77.1)	27 (67.5)
Estadiamento Clínico TNM	n.a**	n.a**	
I/II			16 (40.0)
III/ IV			24 (60.0)
Tamanho do Tumor	n.a**	n.a**	
T1/T2			19 (47.5)
T3/T4			21 (52.5)
Metástases Locoregionais	n.a**	n.a**	
Ausente			23 (57.5)
Presente			17 (42.5)

* CCEB: carcinoma de células escamosas de boca

** n.a: não aplicável ao grupo

Tabela 2 Frequência dos genótipos e alelos dos polimorfismos C1772T e G1790A do gene HIF-1 α nos grupos

Variação Genotípicas	Controles n(%)	Classificação das displasias bucais		P valor*	CEB n (%)	P valor*
		Displasia leve n (%)	Displasia moderada/severa n (%)			
C1772T						
CC	0 (0)	6 (17.1)	1 (7.7)	< 0.001	0 (0)	<0.001
CT	85 (96.6)	14 (40)	8(61.5)		1 (2.5)	
TT	3 (3.4)	15 (42.9)	4 (30.8)		39 (97.5)	
G1790A						
GG	81 (92.0)	5 (14.3)	2 (15.4)	<0.001	2 (5.0)	<0.001
GA	7 (8.0)	23 (65.7)	9 (69.2)		1 (2.5)	
AA	0 (0)	7 (20.0)	2 (15.4)		37 (92.5)	

Todos os valores foram calculados pelo teste χ^2

Comparações: *controle x ED, ** ED x CEB.

Em negrito: resultados estatisticamente significativos.