

Maçanori Odashiro

**AVALIAÇÃO DO FATOR INDUZIDO PELA HIPÓXIA 1-ALFA NO
RETINOBLASTOMA**

Campo Grande

2012

Maçanori Odashiro

**AVALIAÇÃO DO FATOR INDUZIDO PELA HIPÓXIA 1-ALFA NO
RETINOBLASTOMA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Gunter Hans Filho.

Campo Grande

2012

Maçanori Odashiro

Avaliação do Fator Induzido Pela Hipoxia 1-Alfa no Retinoblastoma /
Maçanori Odashiro – Campo Grande, 2012.
xv, 94f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região
Centro-Oeste.

Título em inglês: HIF-1- α in Retinoblastoma.

1. Retinoblastoma. 2. Fator Induzido pela Hipóxia
3. Hipóxia. 4. Tratamento.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na
Região Centro-Oeste

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

Maçanori Odashiro

**AVALIAÇÃO DO FATOR INDUZIDO PELA HIPÓXIA 1-ALFA NO
RETINOBLASTOMA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Andresson P. Figueiredo

Prof. Dr. Miguel N Burnier Jr

Prof. Dr. Marcia S Lowen

Prof. Dr. Livio V Leite

Prof. Dr. Gunter Hans Filho

Aprovada em: 08/03/2012

Dedicatória

*À minha esposa Neuza,
presença marcante em todos os momentos.*

*Aos filhos Danilo, Luciana (e Roberto) e Alexandre (e Patrícia),
motivo de sonhos realizados.*

*Às netas Ester e Clara,
fonte inesgotável de alegria.*

Agradecimentos Especiais

Ao **Prof. Dr. Gunter Hans Filho**, pela orientação na realização desta tese, pelas lições de medicina e vida, e pela amizade de todos esses anos.

Ao Doutor **Miguel Burnier Jr**, pela amizade, total apoio e incentivo à realização deste trabalho.

À toda Equipe do The Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory, especialmente para Sebastian Di Cesari, Emília Anteckka, Alexandre e Patrícia, Bruno F Fernandes, Tamara Grenner, Shawn Maloney, Tiffany Porraccio, Patrick Logan, Matthew Balazsi pela colaboração e ajuda na realização deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Ao Dr Ricardo Dutra Aydos, coordenador do curso de pós-graduação, pelo incentivo e apoio à pesquisa.

Às secretárias Vera Nascimento Silva e Aurea Soares Gobi do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	vi
Agradecimentos Especiais	vii
Agradecimentos.....	viii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Quadros	xiii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xiv
Resumo	xvi
1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Retinoblastoma.....	4
2.1.1 Histórico	4
2.1.2 Genética	5
2.1.3 Incidência, quadro clínico, tratamento.....	7
2.1.4 Aspectos histopatológicos e fatores de prognóstico	15
2.2 Fator Induzido pela Hipóxia.....	26
2.2.1 Hipóxia e Câncer.....	26
2.2.2 As vias de sinalização do FIH	29
2.2.3 FIH-1- α : estrutura e regulação.....	30
2.2.4 Outros membros da família FIH- α	32
2.2.5 FIH e Câncer	33
2.2.6 FIH e Metástase	37
2.2.7 FIH e Angiogênese tumoral.....	38
2.2.8 FIH e Células tronco.....	39
2.2.9 Estratégias para bloquear a via de sinalização do FIH-1- α em câncer	40
2.2.10 Bloqueio direto do FIH-1- α	42
3.0 OBJETIVOS	45
3.1. Geral	45
3.2. Específicos.....	45

4.0 MÉTODOS	46
4.1 Formalização do tema da pesquisa	46
4.2 Duração da pesquisa	46
4.3 Seleção dos casos de RB.....	46
4.4 Análise histopatológica	47
4.5 Imuno-histoquímica.....	47
4.6 Classificação da expressão IHQ da FIH-1- α	48
4.7 Cultura celular.....	49
4.8 Imunocitoquímica.....	50
4.9 Classificação da expressão imunocitoquímica	51
4.10 Estabilização do FIH-1- α com cloreto de cobalto.	51
4.11 Ensaio de Proliferação in vitro após tratamento com o cloreto de cobalto	52
4.12 Silenciamento de gene com interferência mediada pelo RNA.....	52
4.13 Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	53
4.13.1 Extração de RNA.....	54
4.13.2 Síntese de CDNA (transcrição reversa).....	54
4.13.3 Amplificação do DNA através da Reação em cadeia de polimerase em tempo real	55
4.14 Western Blot	56
4.15 Ensaio de proliferação in vitro.....	57
4.16 Análise estatística.	58
5.0 RESULTADOS	60
6.0 DISCUSSÃO	67
7.0 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74

Lista de Figuras

Figura 1 - Aspectos macroscópicos do retinoblastoma.	23
Figura 2 - Aspectos microscópicos do retinoblastoma.	24
Figura 3 - Vias de sinalização do FIH.....	32
Figura 4 - Vias de sinalização relacionadas ao FIH que contribuem para a progressão tumoral.	35
Figura 5 - Fotomicrografias de exemplos de imuno-histoquímica por FIH-1- α	63
Figura 6 - Quantificação por PCR dos níveis de RNA de FIH-1- α	64
Figura 7 - A quantificação de RNA do gen FIH-1- α em células transfectadas com siRNA.	65
Figura 8 - Níveis da proteína FIH-1- α em células sem CoCl ₂ , com CoCl ₂ e no grupo controle, através do <i>western blot</i>	65
Figura 9 - Gráfico mostrando o ensaio de proliferação MTT.	66

Lista de Tabela

Tabela 1 - Resultado dos dados clinicos, histopatológicos e imunohistoquímica	60
Tabela 2 – Estatística descritiva dos escores da expressão de FIH-1- α e variáveis de estudo	62

Lista de Quadros

Quadro 1 - Classificação de Reese-Ellsworth para Retinoblastoma (1963).....	10
Quadro 2 - Classificação dos tumores extra-oculares (CCSG – protocolo 962).	12
Quadro 3 - Classificação da extensão do retinoblastoma.	25

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ABC	complexo avidina-biotina-peroxidase
°C	graus Celsius
CA	câmara anterior
Co	coróide
CoCL ₂	cloreto de cobalto
C02	gás carbônico
Difer	diferenciação
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FIH	Fator induzido pela hipóxia
FIH-1 α	Fator induzido pela hipóxia 1-Alfa
H&E	hematoxilina-eosina
IgG	imunoglobulina G
IHC	Imuno-histoquímica
ICQ	Imunocitoquímica
KD	do inglês <i>knock down</i>
LOX	Lisil oxidase
ml	mililitro
mTor	“mammalian target of rapamycin”
necr	necrose
NO	nervo óptico
OD	olho direito
ODD	domínio de degradação dependente de oxigênio
OE	olho esquerdo
O ₂	Oxigênio
PCR	reação em cadeia da polimerase
RB	Retinoblastoma
Rb	Gen do Retinoblastoma
RMF	Resistência a múltiplos fármacos
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RTE	radioterapia externa
RT- PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
siRNA	do inglês <i>small interfering RNA</i>
SNC	Sistema nervoso central
TCA	ácido tricloroacético
VEGF	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vi	vítreo
%	porcentagem

Resumo

Introdução: o Retinoblastoma é o tumor intra-ocular maligno mais comum na infância. Pacientes com tumores avançados, em geral, respondem mal ao tratamento. Hipóxia é um fenômeno comum aos tumores avançados e está relacionada à resistência à quimio e radioterapia convencional. As células e os tecidos tumorais adaptam-se ao microambiente hipóxico através da ativação de várias vias e moléculas associadas à hipóxia. Destas, o fator induzido pela hipóxia 1 alfa (FIH-1- α) é o fator de transcrição mais importante que regula a resposta celular à hipóxia. **Objetivo:** avaliar a expressão de FIH-1- α no retinoblastoma e avaliar a proliferação das células de retinoblastoma com o bloqueio do gen FIH-1- α . **Material e Métodos:** 21 casos de retinoblastoma foram selecionados do arquivo do The Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory, Universidade McGill, Montreal, QC, Canadá. Foram coletados dados clínicos e realizado estudo histopatológico de todos os casos, além de imunohistoquímica com o anticorpo FIH-1- α . A linhagem de célula de retinoblastoma humano Y79 foi cultivada. As células foram tratadas com Cloreto de Cobalto (CoCl₂) com o intuito de estabilizar a proteína FIH-1- α . Após este tratamento, foi realizada análise dos níveis de RNAm de FIH-1- α por PCR e western blot. Foi realizado o método de siRNA para bloqueio do gen FIH-1- α e, após esse bloqueio, foi realizado ensaio de proliferação para avaliar o efeito na proliferação das células de retinoblastoma. **Resultados:** 85.7% dos casos de retinoblastoma expressaram FIH-1- α . Houve correlação entre a expressão de FIH-1- α com necrose e invasão vítrea. As células de retinoblastoma tiveram aumento significativo de RNAm de FIH-1- α após o tratamento com CoCl₂. Após o bloqueio do gen FIH-1- α com siRNA, houve diminuição significativa da proliferação das células de retinoblastoma. **Conclusão:** Foi demonstrado que a maioria dos retinoblastomas expressam FIH-1- α , e que as células de retinoblastoma apresentam aumento de FIH-1- α após o tratamento com CoCl₂. Além disto, o bloqueio do gen FIH-1- α levou a uma diminuição significativa na proliferação celular. Assim, drogas que inibem FIH-1- α podem ser de grande utilidade no tratamento do retinoblastoma, principalmente em casos avançados onde existe muita hipóxia tumoral.

Palavras-chave: Retinoblastoma, Imuno-histoquímica, Hipóxia celular.

Background: Retinoblastoma is the most common malignant intraocular tumor in childhood. Patients with advanced tumors, in general, respond poorly to treatment. Hypoxia is a common phenomenon for advanced tumors and is associated with resistance to chemotherapy and radiation therapy. Cells and tissues tumor microenvironment adapt to hypoxia by various routes and activation molecules associated with hypoxia. Of these, the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1- α) is the most important transcription factor that regulates the cellular response to hypoxia. Objective: To evaluate the expression of HIF-1- α in retinoblastoma and to evaluate the proliferation of retinoblastoma cells by blocking the gene HIF-1- α . Material and Methods: 21 cases of retinoblastoma were selected from the file of The Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory, McGill University, Montreal, QC, Canada. Clinical data was collected. Histopathological study and immunohistochemistry with the antibody HIF-1- α were performed in all cases. The cell line of human retinoblastoma Y79 was grown. Cells were treated with Cobalt Chloride (CoCl₂) in order to stabilize the protein HIF-1- α . After this treatment, analysis of mRNA levels of HIF-1- α was performed by PCR and western blot. Small interfering RNA (siRNA) was used to block gene HIF-1- α and, after this block, proliferation assay was performed to evaluate the effect on cell proliferation of retinoblastoma. Results: 85.7% of the cases of retinoblastoma expressed HIF-1- α . A correlation between the expression of HIF-1- α with necrosis and vitreous invasion was found. Retinoblastoma cells had a significant increase of mRNA levels of HIF-1- α after treatment with CoCl₂. After blocking the gene HIF-1- α with siRNA, a significant decrease in cell proliferation of retinoblastoma cells was observed. Conclusion: It was shown that most of retinoblastomas express HIF-1- α , and retinoblastoma cells show an increase in HIF-1- α after treatment with CoCl₂. Furthermore, blockade of the gene HIF-1- α resulted in a significant reduction in cellular proliferation. Thus, drugs that inhibit HIF-1- α may be useful in the treatment of retinoblastoma, particularly in advanced cases where there is much tumor hypoxia.

1.0 INTRODUÇÃO

Nos últimos cem anos, observa-se uma mudança nas taxas de sobrevivência dos pacientes com retinoblastoma (RB) passando de 5 para 95%, e os fatores mais importantes responsáveis foram o diagnóstico precoce e melhora no tratamento (Shields, Shields et al. 1993; Shields and Shields 1999).

Houve uma redução do número de enucleações e introdução de técnicas conservadoras, como a quimiorredução e o tratamento local no intuito de diminuir a morbidade e manter a sobrevida (Hadjistilianou et al., 2002); Shields, Honavar et al. 2002; Deegan 2003).

Avanços recentes da medicina têm provido múltiplos agentes para combater o câncer, porém, apesar do diagnóstico precoce, do melhor entendimento da doença e da melhora no tratamento, ainda são observados doença metastática e óbito em RB. Mesmo com o uso de poliquimioterapia, a recorrência do tumor continua sendo um problema crucial, e essa recidiva pode sugerir uma relativa insensibilidade do tumor aos agentes quimioterápicos empregados.

A resistência a múltiplos fármacos (RMF) constitui uma importante barreira para um efetivo tratamento quimioterápico do câncer, e, nos últimos anos, os mecanismos celulares envolvidos na RMF vêm sendo bastante estudados (Gottesman et al., 2002; Thomas & Coley, 2003). A hipóxia tumoral é um dos fatores relacionados à resistência à quimioterapia e radioterapia (Brown & Wilson, 2004).

Hipóxia é um fenômeno comum que ocorre na maioria dos tumores humanos. O microambiente tumoral difere do normal devido ao estatus proliferativo das células tumorais e um suprimento vascular irregular que resulta no desenvolvimento de hipóxia (Wouters & Koritzinsky, 2008). A presença desta está significativamente associada à progressão tumoral agressiva, resistência à quimioterapia e à radioterapia e pior prognóstico. As células e tecidos tumorais se adaptam ao micro-ambiente hipóxico através da ativação de várias moléculas e mecanismos relacionados à hipóxia. (Zhang et al. 2010).

Fatores induzidos pela hipóxia (FIHs) são fatores de transcrição essenciais para a adaptação celular a ela, e esses fatores regulam uma variedade de gens. Em neoplasias malignas, tanto a hipóxia quanto as mutações em oncogenes e gens supressores tumorais aumentam a atividade de FIHs. Muitos gens induzidos por FIH estão criticamente envolvidos em aspectos biológicos das neoplasias malignas, incluindo sobrevivência celular, manutenção de células tronco, diferenciação celular, instabilidade genética, vascularização, reprogramação metabólica, sinalização de fatores de crescimento autólogos, invasão, metástase e resistência a tratamento (Brown & Wilson, 2004).

De todos os FIHs, o Fator Induzido pela Hipóxia-1 (FIH-1) é o prevalente, sendo superexpresso em vários tipos de neoplasias malignas e contribuindo para o crescimento tumoral e angiogênese. FIH-1 é uma proteína heterodimérica composta por 2 subunidades: a FIH-1- α relacionada à regulação de oxigênio (O₂), e a subunidade FIH-1- β que é expressa constitutivamente (Zhang et al. 2010). Em condições de normóxia, a proteína FIH-1- α é degradada

por ubiquitinação e degradação proteossomal após hidroxilação de resíduos da prolina em degradação dependente de oxigênio (Jaakkola, Mole et al. 2001). Em condições de hipóxia, a proteína FIH-1- α acumula-se e transloca-se para o núcleo onde ela se heterodimiza com a subunidade FIH-1- β formando um fator de transcrição ativo. Mais de 100 gens alvo relacionados diretamente ao FIH-1- α foram identificados e muitos deles estão relacionados à angiogênese, invasão e metástase. Assim, o FIH-1- α é um excelente marcador para malignidade tumoral (Semenza, 2003).

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Retinoblastoma

2.1.1 Histórico

O primeiro relato de uma neoplasia com evolução semelhante à do RB não tratado é atribuído a Petrus Pawius (Pieter Pauw), um anatomista holandês que, em 1597, em Leiden, descreveu um caso em criança de três anos de idade com tumor volumoso do olho esquerdo, invadindo a órbita, região temporal e cavidade craniana (Albert, 1987).

Em 1767, Hayes descreveu um tumor bilateral em uma menina de três anos, cujos olhos tinham aspectos que lembravam o olho de um gato no escuro. Durante quase 200 anos, a lesão foi tida como similar a tumores de mama e membros, recebendo a denominação de *fungus haematodes* ou *soft cancer*. Em 1809, o cirurgião escocês James Wardrop descreveu o RB como uma entidade individualizada e foi também quem primeiro relatou a extensão do tumor pelo nervo óptico para o sistema nervoso central (SNC) com metástases para vários órgãos; além de ser também o primeiro estudioso que propôs a enucleação como tratamento, como também a provável origem retiniana, embora nunca tenha conseguido a cura, sendo seu insucesso atribuído a estágios avançados da doença, já com envolvimento do nervo óptico (Kivela & Polkunen, 2003).

O RB recebeu vários nomes, entre eles, neuroepitelioma da retina dado por Flexner, tendo permanecido, por muito tempo, com a denominação de *glioma da retina*, dada por Rudolph Virchow. Muitos nomes foram propostos até que, em 1926, a *American Ophthalmological Society* aceitou o termo retinoblastoma sugerido por Verhoeff (Kivela & Polkunen, 2003)

2.1.2 Genética

O RB é herdado como uma doença mendeliana de padrão autossômico dominante com penetrância incompleta e expressividade variável (Cerecedo Diaz et al., 2003), porém é autossômico recessivo em nível celular, requerendo a inativação de ambos os alelos (Watts, 2003).

O gene do retinoblastoma (Rb), que está localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q14), produz uma fosfoproteína altamente ativa na regulação do ciclo celular. Normalmente, essa proteína funciona com supressor do crescimento, e seu papel foi definido como um antioncogene, ou gene supressor de tumor (McLean 1996; Deegan 2003). O Rb exerce também um papel potencial no desenvolvimento de outros tumores (Deegan, 2003).

Baseado em uma análise matemática, Knudson (1971) propôs uma hipótese de duas mutações para explicar a ocorrência de retinoblastoma nas formas hereditárias e esporádicas, postulando que todos os retinoblastomas ocorrem, com resultado de duas mutações.

Nos casos hereditários, a primeira mutação verifica-se na célula germinativa e a segunda ocorre na célula somática, enquanto, na forma não hereditária, ambas as deleções ocorrem na mesma célula somática e como resultado os tumores são unilaterais, unifocais e com início tardio. Nos pacientes com a forma germinativa, a mutação está presente em todas as células do indivíduo e, em razão disso, ocorrem em uma apresentação precoce, bilateral, ou mesmo, neoplasias primárias múltiplas. Indivíduos com a mutação germinativa têm um risco relativo de 40.000 vezes maior de desenvolver a doença do que a população normal, assim 90% dos indivíduos, que têm essa mutação, vão desenvolver o tumor (Gallie et al, 1991).

Cerca de quarenta a cinqüenta por cento dos portadores de RB têm a forma hereditária da doença, porém 25% desses são casos ditos familiares e o outros 75% são em razão de mutações novas nas células germinativas dos pais (Narod et al., 1991).

Pacientes com RB não hereditário apresentam a doença unilateral e não têm história familiar. Entretanto, 15% dos pacientes diagnosticados, como tendo doença unilateral, são de forma hereditária. Indivíduos com a forma hereditária têm muito maior risco de desenvolver um segundo tumor primário do que aqueles com a forma não hereditária (Draper et al., 1986).

A descoberta de uma história familiar positiva tem uma implicação prática para o paciente e sua família com relação à detecção do tumor e ao prognóstico. Em todos os pacientes com história familiar até, pelo menos, 28 meses de idade, são recomendados exames periódicos (Abramson et al, 1998).

2.1.3 Incidência, quadro clínico e tratamento

O retinoblastoma é o tumor maligno intra-ocular mais freqüente na infância, e é o mais comum da retina com uma prevalência de 1:15.000 a 1:34.000 nascidos vivos (McLean et al., 1994), com quase 5.000 a 8.000 casos novos em todo o mundo. Na Europa, América do Norte e Austrália esse tumor representa cerca de 2 a 4% dos tumores da infância (Parkin et al., 1988; Yeole & Advani, 2002).

A distribuição do RB é mundial, afetando todas as raças sem predileção por sexo. Entretanto, é relatado aumento da incidência do RB em países em desenvolvimento. Em países do continente africano, o retinoblastoma é muito mais freqüente do que qualquer outro tumor intra-ocular, representando de 10 a 15% dos tumores em crianças (Parkin et al., 1988; Wessels & Hesselting, 1996).

No Brasil, é o quarto tumor mais freqüente em crianças até 14 anos de idade, e o registro hospitalar de câncer pediátrico do Hospital do Câncer AC Camargo (São Paulo) aponta o RB como a principal neoplasia maligna no primeiro ano de vida, correspondendo a 11,1% de todos os tumores pediátricos no período de 1988 a 1994. Na Bahia, Fernandes et al (1998) analisaram-se as causas de enucleação, realizadas em crianças abaixo de 12 anos de idade, em hospital universitário, tendo sido encontrado o RB como o responsável por 44,2% de todos os casos e 60% dos casos com até quatro anos de idade.

Geralmente, o diagnóstico é feito antes dos três anos de idade (Spencer et al., 1985). Nos dois primeiros anos de vida, os casos bilaterais são diagnosticados, sendo a média de idade de 5 a 12 meses. Nos casos unilaterais, a média de idade ao diagnóstico é de 24 a 29 meses (Cerecedo Diaz et al., 2003; Watts, 2003).

O quadro clínico é dependente do estágio da doença, tamanho e localização do tumor. A forma trilateral da doença, na qual os tumores oculares são acompanhados por tumores intracranianos neuroectodérmicos primitivos (pinealomas), ocorre em um pequeno número de pacientes (5 a 15%) com doença bilateral (Kivela, 1999).

Os sinais e sintomas do retinoblastoma intra-ocular são bem caracterizados na literatura médica mundial. A leucocoria é o principal sinal que chama a atenção para o diagnóstico do retinoblastoma, levando para encaminhamento ao oftalmologista e se caracteriza-se por um reflexo branco-amarelado na área pupilar, melhor visto em condições de pouca luz. A leucocoria pode ser observada entre 32 a 72,2% dos casos (Abramson et al., 2003; Balasubramanya et al., 2004; Cerecedo Diaz et al., 2003).

No Brasil, foi encontrada leucocoria em respectivamente 70,8 e 66,3% dos pacientes. O segundo sinal mais freqüente é o estrabismo que pode estar presente em 11,2 a 25% (Abramson et al., 2003; Cerecedo Diaz et al., 2003). seguido por sinais inflamatórios, tais como: olho vermelho e pseudocelulite orbitária observados em 6 a 10% dos pacientes (Abramson et al., 2003).

Outras formas de apresentação incluem glaucoma neovascular, buftalmia, hifema e atrofia bulbar (Abramson, Beaverson et al., 2003).

Nos casos de doença mais avançada com comprometimento extra-ocular, podem ser observados sintomas neurológicos, linfonodos palpáveis nas regiões pré-auricular e submandibular e metástases para múltiplos órgãos.

O diagnóstico do retinoblastoma é predominantemente clínico na maioria dos casos, seu aspecto à oftalmoscopia é variável. Geralmente, é uma lesão branco-amarelada que pode estar associada a descolamento de retina, células tumorais semeadas no humor vítreo e áreas de calcificação em seu interior.

Entretanto, em casos de dúvidas diagnósticas, a ultra-sonografia ocular pode ajudar no diagnóstico ao detectar áreas de depósitos de cálcio dentro do tumor. Outros estudos de imagens, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear são necessárias quando não é possível analisar o nervo óptico e o pólo posterior ou quando existe a suspeita de infiltração do nervo óptico e ou coróide (Watts, 2003).

A classificação proposta por Reese e Ellsworth (Reese & Ellsworth, 1963), embora seja de limitada aplicabilidade, para o estadiamento de retinoblastoma intra-ocular é até hoje a mais utilizada. Tem como base os achados oftalmoscópicos, como tamanho e localização do tumor e sua implicação para prever a probabilidade de controle do tumoral e a preservação da visão, com o tratamento disponível àquela época (Quadro 1). Para tumores extra-oculares, a classificação é baseada no exame histopatológico, segundo a classificação dos

tumores extra-oculares – *Children's Cancer Study Group* – CCSG (Wolf et al., 1978). (Quadro 2).

QUADRO 1 - Classificação de Reese-Ellsworth para Retinoblastoma (1963).

Grupo I – Muito favorável

- Tumor solitário, menor que 4 diâmetros papilares (DP) em tamanho, no equador ou posterior a ele.
- Múltiplos tumores, nenhum maior que 4 DP em tamanho, todos até ou atrás do equador.

Grupo II – Favorável

- Lesão solitária de 4 a 10 DP em tamanho, até ou posterior ao equador.
- Múltiplos tumores de 4 a 10 DP em tamanho, atrás do equador.

Grupo III – Duvidoso

- Qualquer lesão anterior ao equador.
- Tumor solitário maior que 10 DP em tamanho, atrás do equador.

Grupo IV – Desfavorável

- Múltiplos tumores, alguns maiores do que 10 DP em tamanho.
- Qualquer lesão que se estenda até a ora serrata.

Grupo V – Muito desfavorável

- Tumores envolvendo mais de metade da retina.
- Presença de sementes vítreas com qualquer tamanho de tumor.

Legenda: DP = Diâmetro papilar ($\pm 1,6$ mm).

QUADRO 2 - Classificação dos Tumores Extra-Oculares (CCSG – protocolo 962).

<p><u>Classe I</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Evidência ao exame anatomopatológico de células tumorais nos canais.• Emissárias esclerais ou células tumorais espalhadas em qualquer tecido episcleral no momento da enucleação. <p><u>Classe II</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Evidência microscópica de tumor na margem de ressecção do nervo óptico <p><u>Classe III</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Tumor orbitário comprovado por biópsia. <p><u>Classe IV</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Células tumorais no líquido ou evidência de infiltração do sistema nervoso central. <p><u>Classe V</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Metástase para a medula óssea, linfonodos cervicais ou em qualquer outro órgão ou região.

Tumores em estado avançado e metastáticos ocorrem com frequência em países em desenvolvimento (Antoneli et al., 2003; Chantada et al., 2003). Em um estudo histológico de 230 casos, no Peru, observou-se que 67,7% dos casos

apresentavam ao diagnóstico estágios avançados da doença (Pérez Samatier et al., 1989).

No Brasil, os estádios extra-oculares ao diagnóstico são freqüentes. Em Recife, Lira e col. (1995), no período de 1980 a 1995, observaram 80,4% de casos de doença extra-ocular ao diagnóstico, Abreu e col. (1999), no período de 1985 a 1997, encontraram 62,1% de casos de doença extra-ocular ao diagnóstico. Kronbauer e col. (2000) observaram 28,5% de doença extra-ocular no momento do diagnóstico em Porto Alegre. O fato pode ser em parte explicado pela elevada média de idade do paciente durante o diagnóstico, sobretudo quando comparamos o intervalo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico que é em média de cinco meses no Brasil (Erwenne & Franco, 1989) e, em média, de oito semanas na Inglaterra (Goddard et al., 1999).

O tratamento do retinoblastoma é complexo e envolve um enfoque multidisciplinar, e o sucesso em sua abordagem terapêutica depende da habilidade do médico detectar a doença, enquanto ainda é intra-ocular (Antoneli, Steinhorst et al. 2003; Watts 2003). O tratamento depende de muitos fatores, como: tamanho e localização, presença de sementes vítreas ou sub-retinianas, descolamento de retina e glaucoma neovascular. Ainda podem ser incluídas a idade do paciente e a lateralidade do tumor.

Com os avanços na terapêutica, a sobrevivência dos pacientes portadores de retinoblastoma passou de 30%, em 1930, para 95%, em 1990.

O tratamento depende do estadiamento da lesão, e a enucleação permanece como a forma mais comum de tratamento, especialmente para casos

unilaterais (Deegan, 2003). Entretanto nos últimos anos, observa-se uma redução do número de enucleação, cerca de 73% na última década contra 96% nos anos 70 do século XX, em razão da introdução de técnicas conservadoras, como a quimiorredução e tratamento local (Hadjistilianou, Mastrangelo et al. 2002; Shields, Honavar et al. 2002).

O tratamento para doença bilateral era preferencialmente enucleação do olho mais comprometido e radioterapia externa (RTE) do outro olho, ou mesmo, RTE bilateral, entretanto, nos últimos anos, com avanços no entendimento do retinoblastoma, seu tratamento mudou drasticamente (Deegan, 2003).

Outras modalidades de tratamento como: placas radioativas de diversos isótopos (Shields, Shields et al. 1993; Shields, Shields et al. 2001), fotocoagulação a laser (Shields and Shields 1990; Shields and Shields 1999), termoterapia transpupilar (Shields et al., 1999), crioterapia, quimioterapia sistêmica associada ou não com tratamento local (Wilson et al., 2001) e, ainda, quimioterapia local como injeção de carboplatina subconjuntival (Friedman et al., 2000) foram introduzidas com o intuito de diminuir a morbidade e mortalidade. Alguns estudos mostram ainda que a quimioterapia pode prevenir o aparecimento da forma trilateral (pinealoblastoma) do retinoblastoma (Shields, Shields et al. 2000; Shields, Meadows et al. 2001).

Alguns estudos mostram bons resultados com o emprego da quimioterapia no tratamento do retinoblastoma (Friedman et al., 2000; Wilson et al., 2001). No entanto, em razão da quimioterapia aumentar o risco de segundo tumor, especialmente, em pacientes com a forma hereditária da doença e do

desenvolvimento de efeitos adversos importantes, tais como: a mielossupressão, alguns autores advogam seu uso apenas nos casos de risco de envolvimento orbitário ou doença metastática (Draper et al, 1986).

A quimioprofilaxia é recomendada para pacientes com invasão pós-laminar ou margem cirúrgica do nervo óptico comprometida (Uusitalo et al., 2001). Em trabalho recente, observou-se também que pacientes com invasão escleral e invasão pós-laminar com concomitante comprometimento da coróide e com alto risco de desenvolvimento de extensão extra-ocular podem ser beneficiados pela quimioterapia adjuvante. Já nos casos de invasão isolada da coróide ainda não existe um consenso na literatura (Uusitalo, Van Quill et al. 2001), embora alguns autores recomendem a quimioprofilaxia para os casos de invasão maciça da coróide (Khelifaoui et al., 1996).

Existem vários protocolos de quimioterapia para retinoblastoma que, normalmente, envolvem uma, duas, três ou mais combinações. Os fármacos mais usados são a carboplatina, a vincristina, o etoposide ou o teniposide associados ou não à ciclosporina A (Wilson et al., 2001).

Relatos de que o uso de quimioterapia pode reduzir o número de enucleações, particularmente, em casos avançados (Reese-Ellsworth - grupo V) são referidos por alguns autores (Shields, Shields et al. 1997), sendo que Shields e col. (Shields et al., 2002) reportaram que foi possível evitar a enucleação em 47% dos casos avançados com a instituição de quimiorredução associada a tratamento focal. Foi relatado na Austrália que a instituição do

tratamento conservador resultou em uma diminuição dramática do números de enucleações sem afetar a sobrevivência dos pacientes (Dondey et al., 2004).

No Brasil, o uso de quimioterapia sistêmica associado a diferentes modalidades de tratamento focal têm permitido uma maior conservação dos olhos, especialmente, nos casos mais avançados (Erwenne and Franco 1989; Antoneli, Steinhorst et al. 2003). Em estudo recente, observou-se conservação de olhos em 25.9% de casos avançados bilaterais (Reese-Ellsworth – grupo V), mas, nos casos com comprometimento extra-ocular, mesmo com o tratamento, a sobrevivência de cinco anos foi de 57,2%, caindo para 10% nos casos com comprometimento do SNC ou metástase a distância.

Em resumo, quanto mais precoce o diagnóstico, menor a extensão da doença, maiores as taxas de sobrevida e menores as seqüelas e efeitos colaterais decorrentes do tratamento instituído.

2.1.4 Aspectos histopatológicos e fatores de prognóstico

O RB é um tumor maligno de origem neuroblástica que pode crescer a partir de todas as camadas da retina. (Figura 1) É composto por células com núcleo grande e basofílico, formato e tamanho variáveis e numerosas figuras de mitose podem ser observadas.

As células tumorais têm notável tendência de crescer em torno de seu próprio aporte sanguíneo, formando manguitos de células viáveis ao longo dos

vasos sanguíneos, “pseudo-rosetas”. Em razão da capacidade do tumor crescer mais rápido que o aporte sangüíneo disponível, são observadas necrose e calcificação a partir de 90 a 110 micra do lúmen vascular (McLean et al., 1994). Esta calcificação distrófica é empregada, como um importante sinal radiológico para o diagnóstico. Foi observada uma relação inversa entre a espessura da “pseudo-roseta” e a atividade mitótica, com diminuição da atividade mitótica à medida que as células do retinoblastoma vão se distanciando do vaso central. (Figura 2 A)

Uma característica comum e importante do tumor é a multiplicidade de origem. Na retina de um olho, podem existir vários focos tumorais independentes.

O padrão de crescimento da neoplasia pode ser dividido em cinco formas, que explicam certas variações clínicas. A forma é endofítica, quando o tumor cresce em direção à câmara vítrea; exofítica quando o tumor cresce em direção ao espaço sub-retiniano, geralmente, levando ao descolamento de retina; mista quando a lesão reúne aspectos das duas formas anteriores; difusa, quando infiltra a retina sem formar grandes massas ou calcificação, sendo esta a forma de mais difícil diagnóstico e, por último, regressão completa espontânea, de causa ainda desconhecida, que ocorre tipicamente, após uma reação inflamatória acentuada, seguida por *phthisis bulbi*.

A formação de rosetas descritas separadamente por Flexner, em 1881, e Wintersteiner, em 1897, e a presença de áreas de aparência benigna, “fleuretes”, descritas por Ts’o e colaboradores (Ts’o et al., 1969; Ts’o et al.,

1970) é considerada como uma tentativa do tumor para a diferenciação em fotorreceptores. (Figura 2 B)

Apesar das rosetas de Flexner-Wintersteiner serem muito características de retinoblastoma, elas são também encontradas em pinealoblastomas e meduloepiteliomas, embora representem diferenciação do tumor, as rosetas são de fato compostas por células malignas. As rosetas de Homer-Wright são menos comuns em retinoblastoma e são encontradas em vários tumores neuroblásticos.

O grau de diferenciação do tumor já foi considerado como de importância prognóstica, e as células do retinoblastoma tornam-se mais indiferenciadas à medida que o tumor cresce, e nos tumores compostos de células indiferenciadas estas seriam associadas com prognóstico ruim (Reese, 1963; Ts'o et al., 1970). Entretanto, estudos mais recentes, com uma análise multivariável mostraram que a presença de rosetas e ou “fleuretes” não guardavam qualquer relação com o prognóstico.

Em razão das altas taxas de cura, em parte pelo reconhecimento precoce e pelas novas modalidades terapêuticas, os índices de cura que se aproximam de 100% são a regra nos países onde o diagnóstico e tratamento são instituídos precocemente, (Khelfaoui, Validire et al. 1996), sendo mais provável que um paciente com RB germinativo morra em decorrência de um segundo tumor primário do que RB metastático (Kopelman et al., 1987).

Em todo mundo, as taxas de sobrevivência chegam apenas a 50%, sobretudo devido às regiões menos desenvolvidas do planeta, nas quais o

tumor, freqüentemente, é diagnosticado mais tarde, tendo já invadido a órbita e ou o cérebro.

O risco acumulado de ter um segundo câncer por volta dos 50 anos de idade é de 51% nos pacientes de tumores bilaterais e somente 5% para pacientes com tumores unilaterais (Wong et al., 1997). Em uma análise de 816 pacientes com retinoblastoma bilateral, observou-se que os pacientes tratados com Radioterapia Externa (RTE), antes dos 12 meses de idade, tinham um risco significativamente maior de ter um segundo tumor no campo da radiação do que aqueles maiores de 12 meses de idade (Abramson, Frank, 1998).

Por causa da evolução rápida de crescimento do retinoblastoma, uma taxa de sobrevida em cinco anos, essencialmente, representa as taxas de cura. Em um estudo de análise multivariável, observaram nos casos em que, a despeito do tratamento, a doença evolui para óbito, isto ocorreu em média 6,4 meses, após o início do tratamento para casos unilaterais e 14,2 meses para os bilaterais e o óbito em decorrência de metástases ocorre, normalmente, nos primeiros cinco anos.

O atraso no diagnóstico é um importante fator associado com doença metastática; uma demora de 120 ou mais dias aumenta significativamente o risco de doença metastática. Na avaliação de Erwenne, Franco (1989), o risco de doença extra-ocular é fortemente dependente da idade ao diagnóstico e na demora do encaminhamento do caso a um centro de referência em oncologia. Os autores observaram também que o intervalo entre a percepção do primeiro

sinal da doença e o comprometimento extra-ocular, quando o tumor não é tratado, é de quase seis meses.

Em uma análise de fatores prognósticos em pacientes com tumores avançados (grupo V), observou-se com relação ao comprometimento extra-ocular que tumores germinativos têm melhor prognóstico do que tumores não germinativos, sugerindo um menor potencial maligno nos casos germinativos. Relatou-se ainda que a remoção de coto do nervo óptico menor do que 5 mm de comprimento, a presença de *rubeosis iridis*, tumores grandes e extensão ao segmento anterior estavam associados a um maior comprometimento extra-ocular (Rubin et al., 1985).

O RB pode se disseminar de quatro maneiras: por invasão do nervo óptico, alcançando o líquido cefalorraquidiano, com implantação de células tumorais no sistema nervoso central; por extensão através da esclera; por via linfática, quando o tumor já invadiu conjuntiva e pálpebras; e por via hematogênica, tida como mais freqüente, em tumores extra-oculares avançados. Tipicamente em lesões metastáticas, o retinoblastoma aparece muito menos diferenciado do que no tumor primário intra-ocular.

Muitos estudos tentaram determinar se os achados macroscópicos e microscópicos têm um valor prognóstico. Encontrar uma maneira de prever quais pacientes estão sob maior risco de desenvolver recorrência local e ou doença metastática, tem motivado alguns estudos (Kopelman, McLean et al. 1987; Khelifaoui, Validire et al. 1996). Em uma análise dos casos do registro de patologia ocular da “Armed Force Institute of Pathology” (AFIP) (McLean et al.,

1994), observou-se que a extensão da invasão do nervo óptico, posteriormente à lâmina cribosa e ao comprometimento das túnica oculares é o fator prognóstico mais importantes. Singh e col. (Singh et al., 2000) publicaram uma revisão geral a respeito dos fatores de risco nessa doença, observando resultados semelhantes.

É consenso que o risco de metástase aumenta com o grau de invasão do nervo óptico e órbita (Kopelman et al., 1987; Shields et al., 1993; Uusitalo et al., 2001). Um estudo com 230 casos de retinoblastoma realizado por Pérez Samatier e col. (1989) relatou envolvimento da coróide em 82% dos casos e invasão do nervo óptico em 66% dos casos, e destes 74,5% evoluíram com envolvimento do SNC. Entretanto, não foi observada relação direta entre invasão da coróide e metástase.

Em um estudo sobre o envolvimento do nervo óptico em retinoblastoma, Magrann e col. classificaram o grau de invasão em: grau I (invasão pré-laminar), grau II (invasão da lâmina cribrosa), grau III (invasão pós-laminar sem acometer a margem cirúrgica) e grau IV (margem cirúrgica comprometida). Os autores observaram uma taxa de mortalidade de 10% em pacientes no grau I, 29% no grau II, 42% no grau III e 78% no grau IV (Magrann et al., 1989). Uusitalo e col. (Uusitalo, Van Quill et al. 2001), em uma revisão de literatura, observaram que, na maioria dos estudos, a invasão anterior à lâmina cribrosa não aumentava significativamente a mortalidade, porém relataram um aumento das taxas de mortalidade de 50 a 81% nos casos de margem cirúrgica comprometida e de 13 a 69% nos casos de invasão pós-laminar. (Figura 2 C)

O achado de invasão das túnicas oculares varia entre os diversos trabalhos. Redler, Ellsworth (Redler & Ellsworth, 1973) encontraram invasão da coróide em 62% dos casos estudados, por outro lado, Shields e col. observaram invasão da coróide em apenas 23% dos olhos analisados. Assim, a importância prognóstica da invasão das túnicas oculares é controversa, e alguns autores (Carbajal 1958; Zimmerman 1961; Messmer, Heinrich et al. 1991; Khelifaoui, Validire et al. 1996) consideram a invasão da coróide como um fator de mau prognóstico, com taxas de mortalidade de 11 a 81% (Uusitalo, Van Quill et al. 2001), enquanto (Redler and Ellsworth 1973; Stannard, Lipper et al. 1979; Rubin, Robison et al. 1985; Magrann, Abramson et al. 1989; Shields, Shields et al. 1993) não acharam que essa associação estivesse presente. Estes autores relacionaram apenas um mau prognóstico, quando havia associação com invasão do nervo óptico. (Figura 2 D)

Khelifaoui e col. (Khelifaoui, Validire et al. 1996), com base no exame histopatológico e evolução clínica de 172 pacientes submetidos à enucleação primária propuseram a classificação em cinco grupos para invasão de túnicas oculares e quatro para invasão do nervo óptico. (Quadro 3) Conforme esses autores, a invasão de nervo óptico, além da lâmina crivosa e ou invasão maciça de coróide, estaria associada a uma maior incidência de desenvolvimento de doença disseminada após enucleação. Os autores encontraram desenvolvimento de doença extra-ocular em 10,2% dos casos com invasão mínima da coróide, 20% dos casos com invasão maciça da coróide, 21,4% dos

casos com envolvimento escleral parcial e 50% dos casos com extensão extra-escleral.

Quanto ao acometimento do nervo óptico, o desenvolvimento de doença extra-ocular ocorreu em 8,2 % dos casos com invasão pré-laminar, 32% dos casos com invasão pós-laminar e 45,4% dos casos com margem cirúrgica comprometida e ou presença de células neoplásicas no espaço subaracnóideo (Khelifaoui, Validire et al. 1996).

Em um estudo sobre achados histopatológicos em RB tratados com quimioterapia, observou-se que 6 (60%) casos apresentavam regressão com componente bem diferenciado, 2 (20%) apresentavam regressão com substituição do tumor por cicatriz glial e calcificação e 2 (20%) mostravam células viáveis poucos diferenciadas. Em um estudo semelhante, observou-se que, em três dos cinco casos, a presença de células tumorais viáveis em diferentes atividades proliferativas indica uma heterogenicidade do tumor, que resulta em distintas sensibilidades ao mesmo tratamento (Khelifaoui et al., 1996).

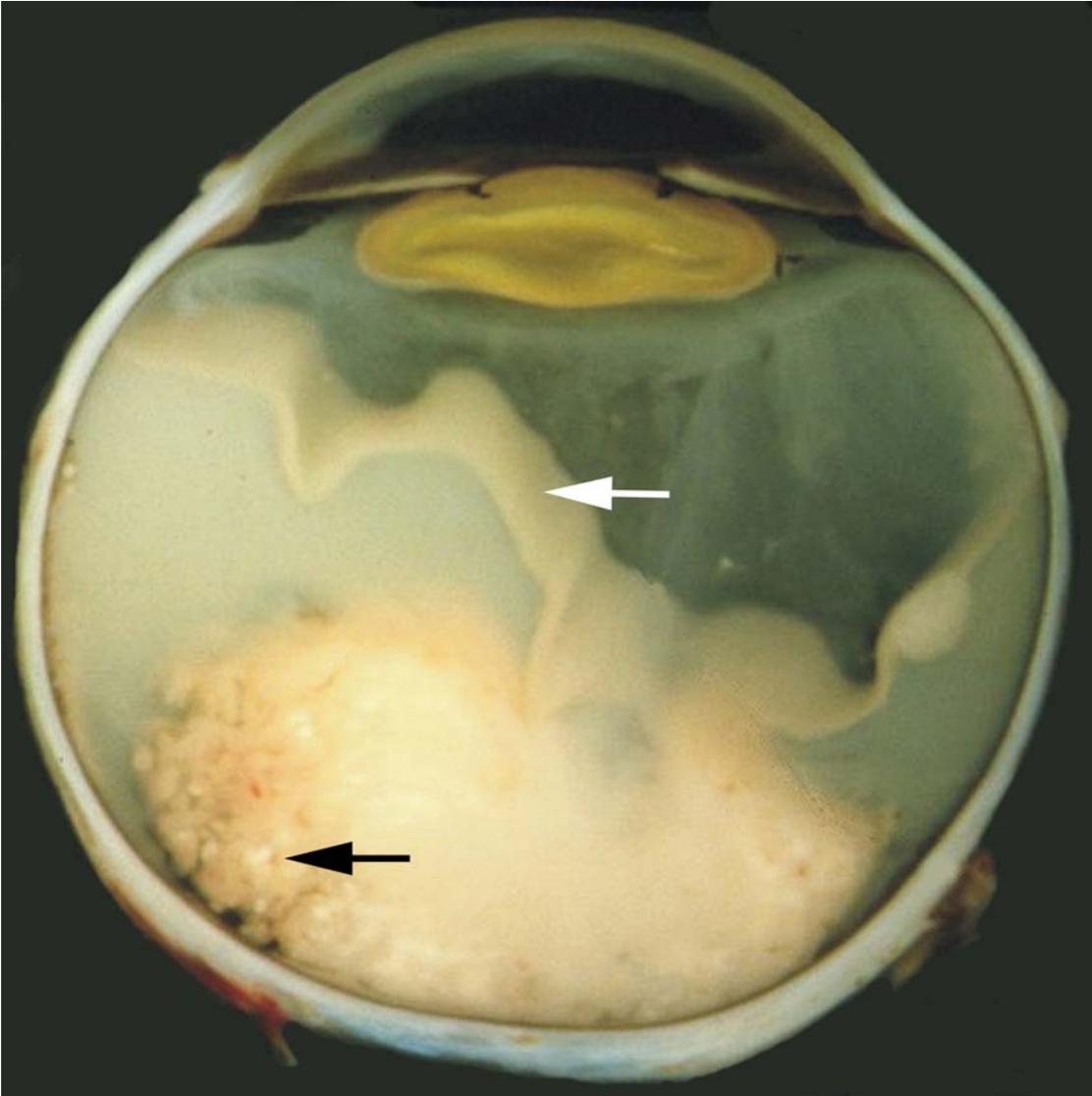


Figura 1 - Aspectos macroscópicos do retinoblastoma, observando-se inferiormente uma grande massa tumoral exofítica, associada com descolamento de retina (seta branca) e áreas de calcificação (seta preta).

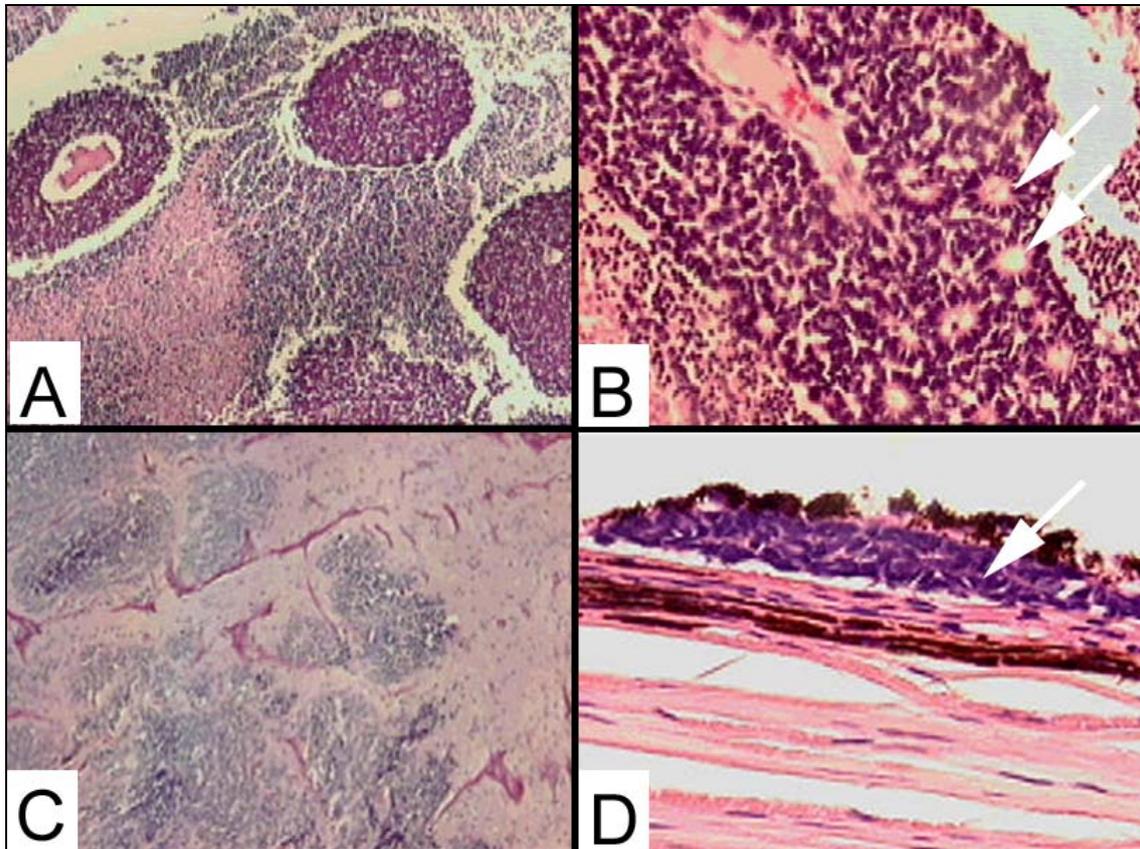


Figura 2 - Aspectos microscópicos do retinoblastoma **A)** Pseudo-rosetas, em que se notam necrose e calcificação a partir de 90 a 110 micros do lúmen vascular (hematoxilina-eosina, magnificação original: 100x). **B)** Áreas com rosetas de Flexner-Wintersteiner (setas) (hematoxilina-eosina, magnificação original: 200x). **C)** Área de infiltração do nervo óptico (hematoxilina-eosina, magnificação original: 40x). **D)** Área de invasão focal da coróide (seta) (hematoxilina-eosina, magnificação original: 400x).

QUADRO 3 - Classificação de Retinoblastoma quanto a invasão de túnicas oculares e do nervo óptico (Khelfaoui, Validire et al. 1996)

INVASÃO DE TÚNICAS OCULARES

- I - Sem invasão de coróide;
- II - Invasão focal de coróide (membrana de Bruch invadida com um a três focos de células tumorais);
- III - Invasão maciça de coróide (qualquer envolvimento maior que o focal);
- IV - Envolvimento de espessura parcial da esclera;
- V - Extensão extra-escleral.

INVASÃO DE NERVO ÓPTICO

- I - Sem envolvimento de nervo óptico;
- II - Invasão sem ultrapassar a lâmina crivosa;
- III - Invasão pós-lâmina crivosa sem acometer a margem cirúrgica;
- IV - Margem cirúrgica comprometida e ou células tumorais no espaço subaracnóideo.

2.2 Fator Induzido pela Hipóxia-1 (FIH-1)

2.2.1 Hipóxia e Câncer

A hipóxia é uma característica comum de diversos tumores malignos, e é uma condição em que células tumorais em proliferação se deprivam de oxigênio devido à limitação de suprimento sanguíneo por microvasculatura tumoral anormal (Vaupel et al., 2007).

Células em estado de hipóxia estão em risco para insultos induzidos por estresse, incluindo dano oxidativo ao DNA, quebras na fita de DNA e aberrações genéticas, no qual pode frear o crescimento e resultar ultimamente em morte celular. No entanto, as células cancerígenas sofrem uma série de mudanças genéticas que aumentam a sobrevivência celular e as permitem a adaptar-se às condições de hipóxia. Sendo assim, as células tumorais hipóxicas que continuam a se proliferar, estão associadas a um fenótipo mais invasivo e metastático, e são usualmente resistentes a tratamentos convencionais como quimioterapia e radioterapia (Hockel & Vaupel, 2001).

De fato, durante baixas concentrações de O₂ (hipoxia), as células ativam várias respostas adaptativas para tentarem sobreviver, incluindo alterações metabólicas e energéticas. As células, temporariamente, diminuem o ciclo celular, diminuem o consumo de energia e secretam fatores pro-angiogênicos (Majmundar et al., 2011).

O entendimento dos mecanismos moleculares nos quais a hipóxia está envolvida com o câncer, e como esses processos são regulados nos diversos tipos de câncer pode resultar em uma maneira mais efetiva de tratar as células tumorais em estado de hipóxia e dos tumores em geral. Um componente central na sinalização da hipóxia celular é o FIH, que está criticamente envolvido tanto na sensibilidade quanto na resposta celular às mudanças na tensão de O₂ celular (Wang et al., 1995).

A hipóxia tumoral tem sido um dos componentes mais estudados do microambiente tumoral. Historicamente, a resistência das células tumorais em hipóxia à radioterapia foi motivo para a realização de vários estudos radiobiológicos sobre hipóxia tumoral, porém mais recentemente, o reconhecimento que a hipóxia causa alterações na função celular levou a uma explosão de publicações neste campo. O número anual de publicações cresceu exponencialmente no início dos anos 1990. Isto coincidiu com a descoberta do FIH-1, um fator de transcrição heterodimérico que promove ativação de fatores induzidos pela hipóxia (Wang & Semenza, 1993). Grande parte dos trabalhos da literatura envolvendo FIH envolve também angiogênese. Isto porque FIH-1 é conhecido por ativar fatores pró-angiogênicos como o VEGF (“Vascular Endothelial Growth Factor”) (Risau, 1997). Sendo assim, é imprescindível considerar a hipóxia tumoral no contexto da angiogênese. Estes dois componentes de um tumor maligno estão intimamente conectados.

Dewhirst e col. (Dewhirst, 2009) resumiram os passos para a hipóxia tumoral:

1) o suprimento arteriolar relativamente esparsso que reduz a quantidade de sangue oxigenado que entra no tumor. Isto leva a concentrações de O₂ muito baixas nos microvasos tumorais que estão longe do suprimento tumoral.

2) a orientação ineficiente dos vasos sanguíneos tumorais levam à abundância de oxigenação em algumas partes tumorais e insuficiência em outras.

3) comparando a periferia tumoral com o centro do tumor, a primeira tipicamente possui densidade vascular menor que a segunda.

4) são observadas grandes variações no fluxo sanguíneo (número de hemácias que atravessam um microvaso por tempo). Alguns microvasos contêm muito poucas ou nenhuma hemácia.

5) as hemácias em hipóxia podem se “encolher” quando comparadas com hemácias bem oxigenadas.

6) isto pode levar a um aumento da viscosidade sanguínea, diminuindo o fluxo e afetando a distribuição das hemácias nas bifurcações

7) grandes comunicações aberrantes arterio-venosas levam à perda de sangue oxigenado da massa tumoral.

8) a demanda de sangue oxigenado pode ser maior que o suprimento.

Todos esses fatores contribuem para a hipóxia tumoral (Dewhirst, 2009).

A sinalização de FIH regula a resposta tumoral à baixa tensão de O₂ através da ativação de mais de 100 gens responsáveis pela produção de proteínas envolvidas em angiogênese, proliferação celular, sobrevivência celular e metabolismo de glicose (Galban & Gorospe, 2009).

2.2.2 A Via de Sinalização do FIH

FIH é um complexo transcricional que é ativado em resposta a mudanças dos níveis de O₂ e intermedeia a expressão de vários genes (Semenza, 2003). Os genes alvos do FIH produzem proteínas que estão envolvidas na regulação de vários aspectos da biologia tumoral, incluindo transporte de O₂, metabolismo do ferro, glicólise, transporte de glicose, proliferação e sobrevivência celular, angiogênese, invasão e metástase (Poon et al., 2009).

A atividade do FIH está desregulada em vários cânceres humanos, e isto é mais comumente devido à hiperexpressão do FIH-1- α , à subunidade reguladora do complexo FIH. Hiperexpressão do FIH-1- α está usualmente associada a aumento da densidade vascular, severidade do grau tumoral, falência ao tratamento e um prognóstico pior (Bos, Zhong et al. 2001). Bloquear a atividade do FIH ou diminuir a expressão do FIH-1- α em tumores tem demonstrado reduzir significativamente o crescimento tumoral em modelos animais (Maxwell, Dachs et al. 1997) e deixa as células tumorais mais suscetíveis aos tratamentos convencionais (Williams, Telfer et al. 2005; Staab, Loeffler et al. 2007).

2.2.3 FIH-1- α : estrutura e regulação

Os FIHs pertencem a uma família de proteínas contendo estruturas relacionadas básico-hélice-alça-hélice. O protótipo da família é o FIH-1 (Poon et al., 2009).

FIH-1 consiste de 2 subunidades: a subunidade reguladora FIH-1- α e a subunidade FIH-1- β que é constitutivamente expressa. A proteína FIH-1- α é composta por 4 domínios funcionais: um domínio bHLH, um domínio PER-ARNT-SIM (PAS) que é um domínio de degradação dependente de O₂ (envolvido em dimerização e ligação ao DNA), e 2 domínios de transativação (N-TAD e C-TAD) que são necessários para ativação transcripcional (Jiang, Rue et al., 1996). O FIH-1- β contém bHLH, PAS e domínios de transativação (Li, Ko et al., 1996).

Enquanto o FIH-1- β está constitutivamente expresso nas células, a disponibilidade do FIH-1- α é dependente dos níveis de O₂ celular. Em normóxia (nível de O₂ em 21%), a proteína FIH-1- α é continuamente expressa e rapidamente degradada (Semenza, 2003). A síntese da proteína FIH-1- α é regulada por mecanismos independentes de O₂ envolvendo sinalização através da ativação de mediadores do fator de crescimento fosfoinositidil-3-quinase e da proteína mitógeno-ativada-quinase. A degradação da proteína FIH-1- α é controlada pelo domínio ODD. A hidroxilação do resíduo de prolina 402 e 564 no domínio ODD do FIH-1- α leva à sua interação com a proteína de supressão tumoral Von Hippel-Lindau, que é o componente de reconhecimento de uma

ligase ubiquitin E3, levando a ubiquitinação da FIH-1- α e sua subsequente degradação pela proteasome 26S (Jaakkola, Mole et al., 2001).

Em condições de hipóxia, há inibição da hidroxilação do prolil no domínio ODD, e não há interação entre a FIH-1- α e a proteína de supressão tumoral Von Hippel-Lindau. Como resultado, há bloqueio da degradação da proteína FIH-1- α e conseqüentemente seu nível aumenta. A proteína FIH-1- α acumulada se transloca para o núcleo onde ela dimeriza com a FIH-1- β . FIH-1 então recruta coativadores transcripcionais como o p300/CBP (p300/CREB-proteína ligadora) e se liga a elementos responsivos de hipóxia nas regiões promotoras dos gens alvos responsivos do FIH-1, mediando assim a ativação de transcrição (Hewitson, McNeill et al., 2002) (Figura 3).

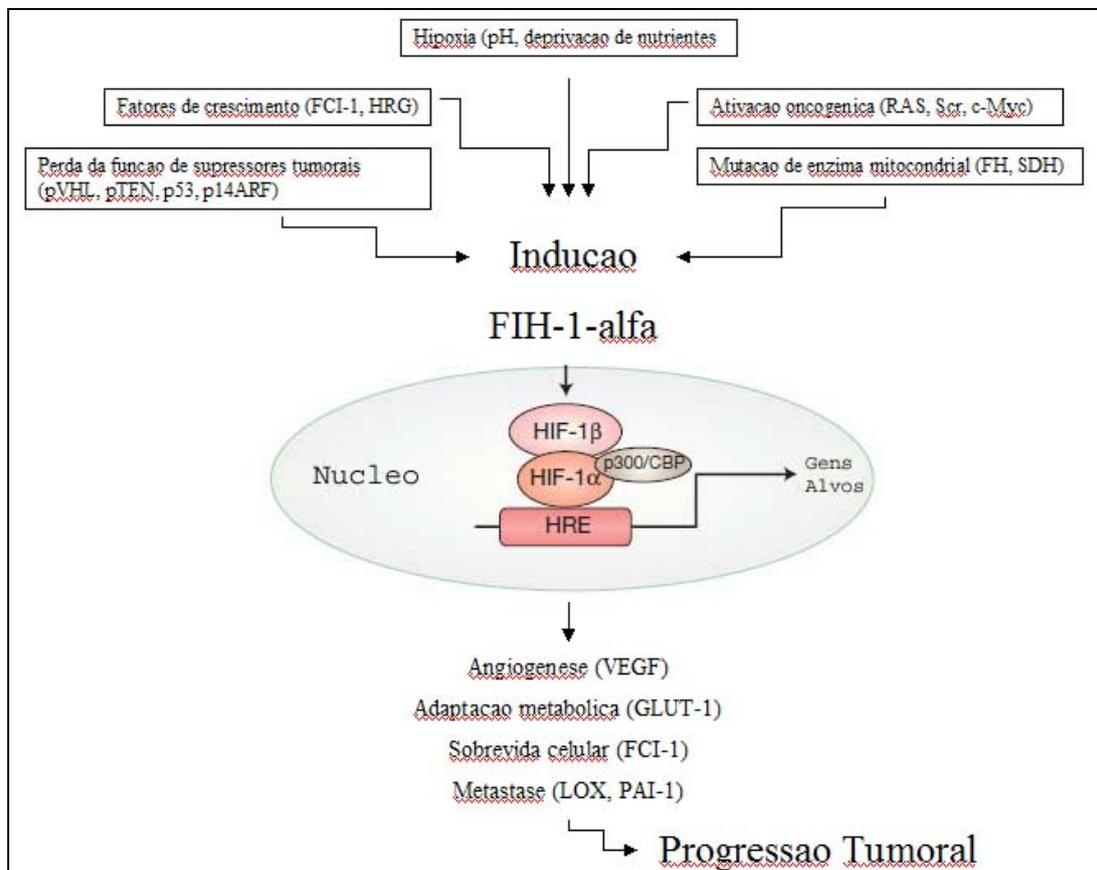


Figura 3 - Vias de sinalização do FIH.

2.2.4 Outros membros da família FIH- α

Existem 2 outras isoformas do FIH- α identificadas: FIH-2- α e FIH-3- α .

O FIH-2- α tem uma estrutura similar ao FIH-1- α (Raval, Lau et al., 2005). Igualmente, o FIH-2- α é rapidamente induzido em resposta à hipóxia e negativamente regulado pela proteína de supressão tumoral Von-Hippel Lindau. Além disto, o FIH-2- α pode promover a ativação da transcrição de vários genes alvos do FIH-1. Entretanto, a expressão do FIH-2- α é específica a certos tipos

celulares e tem um papel biológico diferente do FIH-1- α (Carroll and Ashcroft, 2006). A proteína FIH-2- α tem papel importante no câncer renal e na biologia vascular. FIH-2- α também é expressa em maior nível que o FIH-1- α em diversas linhagens celulares de carcinoma renal com defeito na proteína Von-Hippel-Lindau (Krieg, Haas et al., 2000). Além disto, vários autores reportaram que FIH-1 e FIH-2 por vezes regulam os mesmos gens e por vezes gens distintos (Raval, Lau et al., 2005; Carroll and Ashcroft, 2006).

A função do FIH-3- α ainda não é muito bem entendida. Várias variantes “*splices*” do FIH-3- α foram identificadas. Uma das variantes “*splices*” do FIH-3- α , conhecida como proteína do domínio inibitório do PAS, pode funcionar como um regulador negativo dominante do gen induzido pela hipóxia: ele se liga à subunidade FIH-1- α para formar um complexo não-funcionante no núcleo, impedindo a expressão do gen alvo do FIH-1- α em condições de hipóxia (Makino, Uenishi et al., 2007).

2.2.5 FIH e câncer

Além da hipóxia, a superexpressão de FIH- α (FIH-1- α e FIH-2- α) com ativação da via de sinalização FIH nas células tumorais tem sido demonstrada também com a mutação e perda da função de diversos gens envolvidos nos mecanismos de sensibilidade ao O₂. Como exemplo, mutações com perda de função no gen Von-Hippel Lindau demonstrou aumentar a expressão de FIH-1- α e FIH-2- α nos carcinomas de células claras renais, hemangioblastoma e outros

tumores associados ao gen Von-Hippel Lindau devido à ausência de degradação do FIH-1- α (Maxwell, Wiesener et al., 1999).

Além disto, em diversos tumores como paragangliomas, feocromocitomas, leiomiomas e carcinomas renais, foram descritas mutações na enzima succinil-desidrogenase e fumarase-hidratase, que levam à inibição da atividade da prolil-hidroxilase, resultando em uma estabilização anormal do FIH-1- α e hiperregulação de gens alvos do FIH como o fator de crescimento endotelial vascular (Pollard, Briere et al., 2005).

Desregulação de importantes vias de sinalização de transdução também contribui para a superexpressão de FIH-1- α e ativação de FIH-1 em cânceres. Células tumorais com ativação constitutiva da via Ras-MAPK, Src ou PI3K-AKT-mTOR têm expressão elevada da proteína FIH-1- α (Lee, Kim et al., 2008). Perda da função de proteínas supressoras tumorais como o PTEN e p53 também podem causar aumento da atividade do FIH-1 (Bardos and Ashcroft, 2004).

Os principais mecanismos em que a via de sinalização do FIH-1- α influencia nos tumores está resumida na figura a seguir.

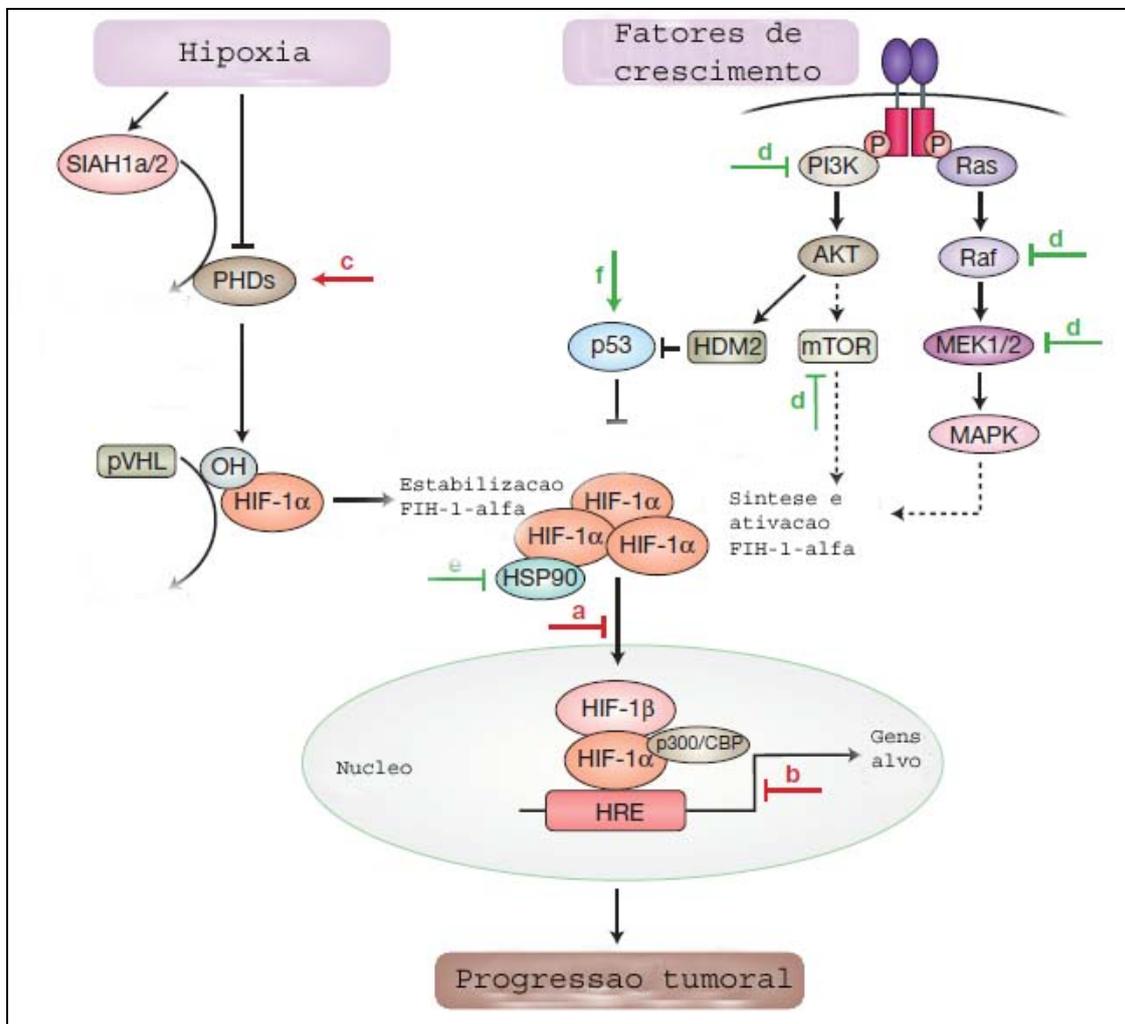


Figura 4 - Vias de sinalização relacionadas ao FIH que contribuem para a progressão tumoral (Poon et al., 2009):

Estudos de imunohistoquímica em tecidos embebidos em parafina demonstraram que diversos tipos de tumores expressam FIH-1- α e apresentam uma forte correlação entre a expressão desta proteína e mortalidade, incluindo tumor pancreático (Miyake et al., 2008), de cabeça e pescoço (Winter et al.,

2006), orofaríngeo, mama, renal (Klatte et al., 2007), ovariano (Osada et al., 2007), urotelial (Ke et al., 2008), bexiga, cerebral, colorretal e prostático (Talks et al., 2000). Uma possível explicação seria que a superexpressão de FIH-1- α , geralmente indicativa de níveis significantes de hipóxia, está envolvida em mediar respostas adaptativas celulares que possibilita a célula sobreviver. Além disto, a hipóxia tumoral e a superexpressão de FIH-1- α correlacionam-se com aumento da agressividade tumoral, angiogênese e metástase, e podem ser utilizadas como marcadores para predizer prognóstico em pacientes com doença metastática (Gruber et al., 2004).

Em um estudo de carcinoma de células claras renais, a expressão de FIH-1- α se correlacionou diretamente com marcadores de apoptose (p53) e inibição de crescimento (p21), com a via de sinalização mTOR (AKT, p27), com receptores quimiotáticos CXCR3 e CXCR4, e proteínas da família VEGF (Klatte et al., 2007). Sendo assim, a indução da proteína FIH-1- α em diversos tipos de tumores resulta em diversas consequências que possibilitam às células tumorais a sobreviver e continuarem a se proliferar.

Porém nem todos os tumores parecem ter associação entre a expressão de FIH-1- α e baixa sobrevida. Em estágios iniciais do carcinoma epidermóide da cavidade oral, Fillies e colaboradores (Fillies et al., 2005) demonstraram que a superexpressão de FIH-1- α está associada a aumento da sobrevida. A explicação dada pelos autores é que a proteína FIH-1- α pode ter função dupla no início da carcinogênese. A proteína FIH-1- α promove angiogênese tumoral e sobrevida celular como uma resposta adaptativa. Porém, em resposta ao

estresse, coopera com o maquinário apoptótico (via indução de gens apoptóticos (como o p53) induzindo a apoptose (Sumiyoshi et al., 2006). Portanto, a função da proteína FIH-1- α na progressão tumoral pode depender do tipo celular e do estágio da carcinogênese. Assim, é necessário estudo em cada tipo específico de tumor para se determinar se um inibidor de FIH-1- α é ou não efetivo (Poon et al., 2009).

2.2.6 FIH e metástase

A hipóxia e FIH influenciam diversos aspectos nas células tumorais relacionado à metástase. Estudos demonstraram que a expressão de FIH-1- α em carcinoma de células renais é suficiente para induzir à perda da proteína E-caderina e aumentar o potencial de invasão dessas células tumorais (Kaelin & Ratcliffe, 2008). Nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, FIH-1- α regula diretamente a transcrição de TWIST1, o que aumenta a invasividade tumoral e metástase (Yang et al., 2008). Em câncer prostático, a FIH-1- α promove a localização nuclear de SNAIL1, de maneira dependente do VEGF. Este achado é clinicamente relevante e implica expressão de FIH-1- α na progressão deste tumor, pois carcinomas prostáticos de baixo grau reprimem FIH-1- α através da atividade do receptor B estrogênico, enquanto carcinomas de alto grau têm a atividade do receptor B estrogênico diminuído, resultando em alta expressão de FIH-1- α , localização nuclear de SNAIL1 e metástase (Mak et al., 2010).

É sabido que FIH-1- α induz lisil oxidase (LOX), que é uma enzima remodeladora da matriz extracelular e também regulador de SNAIL1. A inibição de LOX reduz invasão tumoral, adesão e metástase em modelo de carcinoma de mama (Bertout et al., 2008). Foi ainda sugerido que LOX secretado pelo tumor primário remodela sítios pré-metastáticos distantes, recrutando células tumorais e estromais (Erler et al., 2009). O microambiente tumoral hipóxico, portanto, promove metástase através da ativação de múltiplos gens FIH-responsivos que, em conjunto, regulam todos os passos para a disseminação tumoral, incluindo invasão, intravasão e extravasão distante (Majmundar et al., 2011).

2.2.7 FIH e angiogênese tumoral

Em relação à angiogênese, FIH exerce efeitos similares nas células endoteliais tanto em tumores quanto em tecidos saudáveis. Entretanto, diferentemente dos vasos sanguíneos em tecidos normais, a vasculatura associada aos tumores são descontínuas e tortuosas. O endotélio dos vasos tumorais interage com as células tumorais, assim como com as células estromais não tumorais. Estas células estromais diferem de tecido para tecido, e elas respondem diferentemente ao estresse hipóxico, o que pode contribuir para as diferenças na angiogênese tumoral. No glioblastoma, por exemplo, a atividade do HIF promove angiogênese tumoral e a supressão de FIH-1- α reduz o remodelamento vascular e normaliza a vasculatura tumoral (Du et al., 2008). Paradoxalmente, a depleção de FIH-1- α no glioblastoma também aumenta a

invasão peri-vascular por causa do efeito direto da diminuição dos níveis de VEGF na migração das células do glioblastoma (Du et al., 2008).

Nas células mielóides, a deleção do gen VEGF, que é um gen alvo do FIH, aumenta o crescimento tumoral, a oxigenação tumoral e a sensibilidade tumoral à quimioterapia, provavelmente pela `normalização` da vasculatura tumoral (Stockmann et al., 2008). Vários estudos ilustram que, dependendo do tipo celular, a vasculatura tumoral responde diferentemente, e até mesmo de maneira oposta à atividade do FIH. Sendo assim, para uma estratégia terapêutica anti-tumoral, a manipulação seletiva do *stress* hipóxico nos diferentes subcompartimentos do tumor pode ser mais efetiva que a inibição do FIH sistemicamente (Majmundar et al., 2011).

2.2.8 FIH e células tronco

A hipóxia pode promover um estado indiferenciado em algumas populações de células tronco e células progenitoras (Yoshida et al., 2009). Similarmente, a hipóxia e FIH podem contribuir para a manutenção de células cancerígenas `totipotentes`. Um estudo interessante mostrou que uma pequena porção de células imaturas de casos de neuroblastoma humano são positivas pra FIH. Após o silenciamento do FIH, estas células sofreram diferenciação simpática. Entretanto, não se sabe ao certo a verdadeira identidade e o papel destas células (Pietras et al., 2009).

2.2.9 Estratégias para bloquear a via de sinalização do FIH-1- α em câncer

Desde que Thomlinson e Gray propuseram a existência de células em hipóxia em tumores sólidos há mais de 1 século, estas células tumorais hipóxicas têm sido reconhecidas como problemas em relação à resistência à quimio e radioterapia, e preditoras de recorrência tumoral e mal prognóstico. Primeiramente, foram criadas estratégias contra células tumorais que têm como alvo a hipóxia, focando na sensibilização da resposta tumoral às terapias contra o câncer através do desenvolvimento de agentes químicos modificadores oxigênio-símile e pró-drogas citotóxicas hipóxia-seletivas (Ahn & Brown, 2007; Nagasawa et al., 2006).

Um dos mecanismos chaves da seletividade de hipóxia são bioredutores para gerar espécies ativos no tecido hipóxico. Utilizando mecanismos de ativação por bioredutores, várias pró-drogas hipóxia-seletivas foram desenvolvidas (Kizaka-Kondoh & Konse-Nagasawa, 2009). Em especial, compostos nitro-aromáticos (ex. Nitroimidazoles) e heterociclos aromáticos eletrôn-deficientes (ex. Quinonas, óxido de benzodiazino di-N) são compostos tipicamente seletivos de hipóxia pelos seus potenciais de redução (Ahn & Brown, 2007).

Apesar de não haver agentes aprovados para uso clínico, ainda, diversos ensaios clínicos estão sendo feitos com diversas drogas seletivas de hipóxia como E09, CB1954, RP104, Tirapazamina e AQ4N (Chen & Hu, 2009). Por

exemplo, a droga TX-402 suprime a indução de mRNA de Glut-1, Glut-3 e VEGF em doses não citotóxicas, e inibe a angiogênese em doses mais altas (Nagasawa et al., 2003). Os seus potentes efeitos anti-angiogênicos podem ser atribuídos pela supressão de VEGF através do bloqueio da via FIH-1- α . Estes resultados sugerem que as citocinas hipóxia-seletivas podem afetar as respostas adaptativas à hipóxia, incluindo neoangiogênese, glicólise e metástase, o que está associado com os seus efeitos citostático mediado pela inibição da via FIH-1- α durante a hipóxia moderada (Nagasawa et al., 2006).

Como mencionado, a adaptação à hipóxia é crítica para a sobrevivência das células cancerígenas no microambiente tumoral. Desde que a FIH-1- α foi identificada como a reguladora mestra da resposta celular à hipóxia, ela surgiu como um atrativo molecular para terapia contra o câncer (Semenza, 2003). Inibidores de FIH-1- α foram desenvolvidos em todo o mundo e uma grande quantidade de compostos foram identificados na última década (Rapisarda et al., 2002). Muitos deles são agentes biológicos ativos já utilizados e que possuem multi-funções além da inibição do FIH- α . Diversas novas drogas anti-câncer tem demonstrado inibir FIH-1- α através de uma variedade de mecanismos moleculares (Melillo, 2007).

Os inibidores do FIH- α previamente descobertos podem ser divididos em alguns grupos baseados nos alvos ou vias moleculares nas quais eles atuam, que são: via de sinalização oncogênica que induz FIH- α , via mTOR, transcrição de mRNA do FIH- α , translação da proteína, degradação proteossômica, dimerização, ligação ao DNA e atividade transcricional (Onnis et al., 2009).

Enquanto o complexo transcripcional FIH é um alvo terapêutico desafiador, o bloqueio da via de sinalização FIH, e inibição da expressão da proteína FIH- α é muito atraente devido ao seu importante papel na angiogênese e na progressão tumoral. A superexpressão de FIH-1- α em diversos tipos de câncer e a desregulação da atividade do FIH conferem um grau de sensibilidade às células tumorais sobre o tecido normal, e o bloqueio do FIH-1- α , especialmente em combinação com as terapias convencionais, tem um impacto significativo no crescimento tumoral (Bastien et al., 2009).

2.2.10 Bloqueio direto do FIH-1- α

O bloqueio direto do FIH-1- α tem sido feito através de meios específicos antisense, que reduzem a expressão e atividade transcripcional do FIH-1- α (Yeo et al., 2004). Uma forma negativa dominante do FIH-1- α também tem sido usada (Chen et al., 2003).

Um outro método é inibir a atividade transcripcional do FIH-1- α bloqueando interações proteína-proteína. Por exemplo, a ligação entre FIH-1- α e o co-ativador p300CBP, afetando conseqüentemente a transcrição hipóxia-induzida, pode ser atenuada por uma expressão retroviral de um polipeptídeo, por uma pequena molécula quetomina ou por uso de um composto indazole YC-1. Além disto, pequenas moléculas como a rolitetraciclina que bloqueiam a dimerização de FIH-1- α e FIH-1- β pelo bloqueio do domínio PAS, oferecem uma estratégia para bloquear a atividade mediada de FIH-1 nas células tumorais

através da inibição da formação do complexo FIH-1 (Choi et al., 2008; Li et al., 2008; Zinzalla & Thurston, 2009).

Existem 2 principais formas de FIH: FIH-1- α e FIH-2- α , sendo que os 2 se ligam a elementos de resposta à hipóxia e ativam a transcrição gênica destes elementos. Apesar de similaridades entre FIH-1- α e FIH-2- α em termos de estrutura, função e regulação, alguns estudos sugerem que eles não são exatamente iguais. Por exemplo, em um modelo animal de carcinoma de células claras renais, o FIH-1- α inibiu a proteína c-Myc e suprimiu o crescimento tumoral, enquanto que o FIH-2- α potencializou a atividade transcrricional de c-Myc e promoveu o crescimento tumoral por uma mudança adaptativa a um fenótipo mais oxidativo (Biswas et al., 2010). Por outro lado, tanto o FIH-1- α quanto o FIH-2- α mostraram papel igual para promover angiogênese e crescimento em carcinoma epidermoide oral, o que sugere que um tratamento combinado inibindo FIH-1- α e FIH-2- α pode ser bom para pacientes com este tipo de tumor (Zhu et al., 2010).

Por causa destes estudos, existe grande interesse em relação ao desenvolvimento de inibidores específicos. Entretanto, é extremamente difícil obter pequenas moléculas inibidoras por causa da grande similaridade estrutural, exceto através de siRNA e RNA antisense. Como consequência da validação dos efeitos antitumorais dos inibidores de FIH-1- α in vivo, foi sugerido que os inibidores de FIH-1- α não devem ser utilizados como um agente citotóxico único contra as células cancerígenas. Porém, o FIH-1- α definitivamente tem um importante papel na homeostase do oxigênio no

microambiente que medeia a manutenção das células tumorais e o estado de células tronco. Por isso, os inibidores não citotóxicos de FIH-1- α devem ser mais importantes para restaurar o microambiente tumoral ao estado de normóxia e utilizados em conjunto com drogas citotóxicas, resultando na melhora do prognóstico e na prevenção de recorrências(Nagasawa, 2011).

A heterogeneidade no microambiente tumoral leva a diferentes gradientes nas taxas de proliferação celular, regiões de hipóxia e baixa disponibilidade de nutrientes, o que pode produzir um fenótipo tumoral mais resistente e maligno (Bertout et al., 2008). Estas células, com baixa capacidade proliferativa, se tornam tolerantes à hipóxia e deprivação de nutrientes, adaptando-se ao microambiente. As respostas adaptativas ao microambiente tumoral são orquestradas através da ativação de múltiplas vias de sinalização implicadas em sensibilidade ao oxigênio. A homeostase do oxigênio regulada pela via FIH-1 é a melhor entendida. FIH-1 também funciona como um regulador chave na bioenergética do câncer juntamente com o c-Myc e P53, mediando glicólise aeróbica implicada no efeito de Warburg (Dang et al., 2009).

3.0 OBJETIVOS

3.1. Geral

- Estudar a ação do FIH-1- α no retinoblastoma.

3.2. Específicos

A) Avaliar a expressão da proteína FIH-1- α em casos de RB por imunohistoquímica e correlacionar com fatores histopatológicos prognósticos e com a necrose tumoral.

B) Avaliar os níveis de RNA de FIH-1- α das células de RB quando expostas ao CoCL2 e comparar com as células não expostas (grupo controle).

C) Avaliar os níveis de RNA de FIH-1- α das células de RB após o bloqueio do gen FIH-1- α com siRNA nas células expostas e não tratadas com CoCL2.

D) Avaliar a proliferação das células de RB após bloqueio do gen FIH-1- α através de siRNA nas células tratadas e não tratadas com CoCL2.

4.0 MÉTODOS

4.1 Formalização do tema de pesquisa

O projeto foi avaliado, discutido e modificado pela equipe do *The Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory*, para melhor atender às exigências da metodologia científica.

O projeto foi aprovado pelo diretor do laboratório *The Henry C. Witelson Ocular Pathology*, Dr. Miguel N. Burnier Jr., Universidade McGill, Montreal, QC, Canadá.

4.2 Duração da pesquisa

O projeto foi realizado entre julho de 2010 e novembro de 2011.

4.3 Seleção dos casos de RB

Vinte e um casos de RB que foram submetidos à enucleação e com estudo anatomo-patológico no *The Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory*, Universidade McGill, Montreal, QC, Canadá, foram selecionados. Os casos foram selecionados para este estudo baseados na disponibilidade de informações clínico-patológicas e de tecido representativo. Os arquivos do *Henry*

C. Witelson Ocular Pathology Laboratory foram revisados com objetivo de coletar as seguintes informações clínicas: idade do paciente, sexo, olho afetado.

4.4 Análise histopatológica

As lâminas de H&E foram analisadas por dois investigadores que avaliaram a presença ou não de células tumorais viáveis, o grau de diferenciação do tumor, o acometimento da câmara anterior, da coróide, vítreo e a invasão do nervo óptico além da lamina crivosa. A avaliação da necrose, para fins estatísticos, foi classificada da seguinte forma: tumores com mais de 50% de necrose e tumores com menos de 50% de necrose. O grau de diferenciação foi classificado baseado nas porcentagens de rosetas de Flexner – Wintersteiner e Homer Wright presentes, sendo considerado um tumor bem diferenciado quando mais de 80% da área apresentava rosetas, e pouco diferenciado quando estas estavam ausentes. O restante dos tumores foi classificado como moderadamente diferenciado (Schouten-van Meeteren, van der Valk et al., 2001).

4.5 Imuno-histoquímica (IHQ)

A técnica de IHQ foi realizada, automaticamente, pelo método indireto do complexo avidina-biotina (ABC) (Burnier, Neves et al. 1988; Alves 1998), no sistema Ventana®, para a pesquisa e localização do antígeno FIH-1- α nos

tecidos embebidos em parafina, utilizando-se o anticorpo monoclonal de camundongo anti-HIF-1- α (NB100-105 Novus Biologicals, EUA) em diluição 1:50.

O protocolo imunohistoquímico utilizado foi previamente padronizado em todas as amostras com o uso da máquina totalmente automatizada *Ventana Benchmark LT* (*Ventana Medical Systems Inc.*, Tucson, Arizona, EUA), programada para o complexo padrão avidina-biotina para o anticorpo anti-HIF-1- α .

O procedimento pode ser resumido da seguinte forma: as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-HIF-1- α em diluição 1:50 por 30 minutos a 37°C. No passo final, um anticorpo secundário biotilado (anticorpo secundário vermelho-rápido para microscopia óptica e FITC para microscopia confocal) foi aplicado por 8 minutos a 37°C.

Cortes incubados com soro não-imune (solução de BSA em tampão TRIS a 0,1%) ao invés do anticorpo primário, foram usados como controles negativos. Cortes de adenocarcinoma de cólon serviram de controle positivo para o anticorpo anti-HIF-1- α .

4.6 Classificação da expressão IHQ da HIF-1- α

Após a realização da IHQ, as lâminas foram analisadas por microscopia óptica e classificadas quanto à intensidade e à porcentagem de células positivas. Quanto à intensidade, os casos foram classificados em negativo (0),

fraco (1), moderado (2) ou intenso (3). Quanto à porcentagem, os casos foram classificados em negativo (0), 1-25% (1), 25-50% (2) e 50-100% (3) das células positivas para FIH-1- α .

A classificação final da reação IHQ foi obtida com a soma da classificação da quantidade e da qualidade acima descritas. Por exemplo, um espécime classificado em +1 e +2 quanto à quantidade e qualidade de reação respectivamente, terá como classificação final o score de 3. Essa classificação foi previamente estabelecida (Remmele & Stegner, 1987).

Dois patologistas classificaram as amostras em duas ocasiões diferentes sem conhecimento dos dados clínicos dos pacientes tampouco do resultado de sua avaliação anterior ou da avaliação do outro observador.

Quando houve conflitos na avaliação, estes foram resolvidos por acordo mútuo entre os observadores, e a decisão final foi utilizada na análise dos resultados.

4.7 Cultura Celular

O mesmo protocolo de cultura celular foi utilizado em todos os experimentos. A linhagem de células de RB humanas (Y79) foi incubada a 37⁰C em uma atmosfera umidificada enriquecida com 5% de CO₂. A linhagem celular Y79 foi obtida através da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA).

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Burlington, Ontário, Canadá), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (FBS),

1% de fungizone e 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen). As células foram dispostas em monocamada em frascos de cultura de 25cm² (Fisher, Whitby, Ontário, Canadá) e observadas 2 vezes por semana, a cada troca do meio, em relação ao crescimento normal através de microscópio de contraste.

Adicionou-se 0,05% de tripsina com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Fisher, Whitby, Ontário, Canadá) a 37^oC às células já crescidas, e estas foram lavadas com 7 ml de meio RPMI-1640 antes de serem centrifugadas a 120g por 5 min para formar um sobrenadante. Posteriormente, as células foram suspensas em 1 ml de meio RPMI-1640 e contadas utilizando-se o teste de exclusão de azul de tripan.

4.8 Imunocitoquímica (ICQ)

Amostras da linhagem de células de Rb humanas (Y79) foram preparadas com Cytospin Centrifuge (SHANDON Inc. Pittsburgh, PA, USA). Para a técnica de ICQ, 1x10⁶ células foram aposicionadas em lâminas de vidro e fixadas com paraformaldeído a 2%. A técnica foi realizada automaticamente pelo método indireto do complexo avidina-biotina (ABC) (Burnier, Neves et al. 1988; Alves 1998), no sistema Ventana®, para a pesquisa e localização do antígeno FIH-1- α nos tecidos embebidos em parafina, utilizando-se o anticorpo monoclonal de camundongo anti-HIF-1- α (NB100-105 Novus Biologicals, EUA) em diluição 1:50.

4.9 Classificação da expressão imunocitoquímica de FIH-1- α

Após a realização da ICQ, as lâminas foram analisadas por meio de microscopia óptica e classificadas quanto à positividade da reação ICQ em:

- negativa: quando nenhuma célula neoplásica demonstrou reação distinta e
- positiva: quando qualquer número de células neoplásicas demonstraram reação distinta, independente da intensidade da coloração.

4.10 Indução química de hipóxia com cloreto de cobalto

A estabilização do FIH-1- α é equivalente a uma indução química de hipóxia. Para mimetizar o efeito da hipóxia no FIH-1- α , as células foram tratadas com cloreto de cobalto (CoCl_2 , Sigma, St. Louis, MO, EUA) em uma concentração de $100\mu\text{M}$ por 24 horas. Esta concentração bem como o tempo de exposição foi escolhido de acordo com a literatura (Pistollato, Rampazzo et al. 2009).

4.11 Ensaio de Proliferação *in vitro* após tratamento com o cloreto de cobalto

Ensaios de proliferação *in vitro* foram realizados para determinação da habilidade de proliferação das linhagens celulares estudadas (Y79 e Weri-Rb1) mediante a adição de CoCl₂ ao meio celular.

O kit de ensaio baseado em Sulforrodamina-B (TOX-6, Sigma-Aldrich) foi utilizado seguindo o protocolo do Instituto Nacional do Câncer dos EUA (Skehan, Storeng et al. 1990). Brevemente, as linhagens celulares de RB estudadas foram implantadas em poços em uma concentração de $2,5 \times 10^3$ de células por poço, em um mínimo de 6 poços por linhagem celular. Uma linha de 3 poços de cada linhagem celular foi exposta ao CoCl₂ conforme descrito anteriormente.

4.12 Silenciamento de gene com interferência mediada pelo RNA

Para mimetizar o efeito das drogas anti-FIH-1- α , foi realizado o silenciamento do gene dessa proteína, com interferência mediada pelo RNA. Silenciamento do gene do FIH-1- α mediada por RNA foi designado e produzido por *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg, Alemanha) e tem como alvo as seguintes seqüências *sense* e *antisense* respectivamente: F-5'-CUGAUGACCAGCAACUUGA-3' R-5'-UCAAGUUGCUGGUCAUCAG-3'. A transfecção foi realizada usando-se o reagente *Interferin* (polyplus-transfection Inc., NY, EUA) segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, células foram

encubadas numa concentração de 1×10^5 células por poço num mínimo de 6 poços por linhagem celular. Simultaneamente 37.5 ng de siRNA foram diluídos em 100 μ l de meio RPMI-1640 sem FBS com 3 μ l do reagente de transfecção *Interferin*.

A formação de complexos foi obtida através de incubação em temperatura ambiente por 10 min. A solução foi então adicionada gota a gota nas células localizadas nos 6 poços e incubadas a 37⁰C por toda a noite numa atmosfera humidificada enriquecida com 5% de CO₂. As células foram então separadas em dois grupos: 1) células transfectadas e 2) células não-transfectadas, e utilizadas para todos os experimentos.

4.13 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT- PCR)

Com o objetivo de confirmar os resultados do silenciamento do gene FIH-1- α com interferência mediado pelo RNA, realizou-se amplificação do fragmento de DNA correspondente a esse gene através de transcrição reversa seguida de RT-PCR em células de RB transfectadas e não-transfectadas. Para tanto foram necessárias 3 etapas: 1) extração de RNA; 2) síntede de cDNA (transcrição reversa) e 3) amplificação do DNA através da RT-PCR.

4.13.1 Extração de RNA

Para extração do RNA total foi utilizada solução monofásica contendo fenol e tiocinato de guanidine (Trizol®, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA), seguindo protocolo previamente descrito. O RNA total extraído foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Biochrom Ltda., Cambridge, United Kingtown). A absorvência foi medida a 260 e 280 nm de comprimento de onda. A quantidade total de RNA na amostra foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{Absorvência a 260 nm} \times \text{fator de diluição da amostra} \times 40}{1000}$$

Para a verificação da pureza do RNA extraído calculou-se a razão entre a medida a 260 nm e a 280 nm. Valor entre 1,5 e 2,0 indica grau de pureza satisfatória.

4.13.2 Síntese de CDNA (Transcrição Reversa)

Dois μg de RNA total de cada linhagem celular estudada foram incubados com solução que digere DNA de fita única ou dupla, na concentração de 1U/ μl (Desoxyribonuclease I, Gaithersburg, MD, USA). Esse passo é fundamental para evitar contaminação e amplificação do DNA genômico já que a técnica de PCR não é capaz de diferenciar o cDNA sintetizado pela transcrição reversa do DNA

genômico celular. Posteriormente, a DNase foi inativada pela adição de EDTA e calor.

O composto obtido (11 μ l) foi então submetido imediatamente ao processo de transcrição reversa, adicionando-se 10 μ l de mistura contendo:

1. 10 mM de dNTP (coquetel de nucleotídeos, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)
2. 4 μ l de tampão 5x *first strand* (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)
0.1M de DTT (ditiotreitól, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)
3. 40 U/ μ l de iniciador de RNase (Amersham Biosciences)
4. 200U de transcriptase reversa (Moloney murine leukemia vírus, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)

Após adição de todos os reagentes, incubou-se a 37°C por 60 min e posteriormente inativou-se a reação aquecendo-a a 95°C por 10 min. Terminada a reação de transcrição reversa, a mistura foi diluída com água MilliQ autoclavada até o volume de 100 μ l e usada para a amplificação do DNA através da RT-PCR. O material não-utilizado foi mantido a -20°C. Uma mostra ausente de transcriptase reversa foi usada como controle negativo.

4.13.3 Amplificação do DNA através da reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)

Após a obtenção do cDNA, pela da etapa de transcrição reversa, realizou-se a amplificação através de RT-PCR do fragmento de cDNA correspondente ao

mRNA do PSMD1. A RT-PCR foi realizada usando a *PCR Green SYBR Quantitect One Step* (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Para todos os experimentos foi utilizado o termociclador *Chromo4* (MJ Research) e todos os resultados foram analisados pelo software *GeneEx*. Para avaliar a integridade do DNA extraído, a expressão de beta actina foi utilizada como controle.

Em resumo, uma incubação inicial a 50°C por 30 min, foi seguida de uma incubação a 95°C por 15 min, ativando assim a HotStarTaq DNA polimerase para formar cDNA. As condições para amplificação do DNA foram as seguintes: 15 seg a 94°C para desnaturação, 30 seg a 55°C para anelamento, 30 seg a 72°C para extensão, finalizados com uma leitura por fluorescência. 35 ciclos foram repetidos e posteriormente foi realizada uma análise da amostra com temperatura entre 60°C e 95°C.

4.14 Western Blot

Para avaliar os níveis da proteína anti-FIH-1- α nas diferentes condições estudadas, foi realizado Western Blot. As amostras foram preparadas por lise direta de 10^6 células de RB transfectadas e não-transfectadas em 20 ml de solução tampão (20mM ditiltreitol 1%, sulfato dodecil de sódio (SDS) 6%, 0.25 MTRIS pH 6.8, glicerol 10%, 10 mM de fosfato de sódio e azul de bromofenol). Os extratos foram aquecidos em água fervente por 5 min e depois rompidos por energia ultra-sônica por 5-10 seg cada. Após centrifugação a 16.000g por 5 min

para remoção de todos os debris, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Para cada amostra, 20 μ l de proteína foram submetidos a uma eletroforese em gel SDS-PAGE (acrilamida/bisacrilamida 29:1), sendo o gel de separação a 12% e o gel de empilhamento (*stocking gel*) a 4%, de acordo com o protocolo de Laemmli. Marcadores de peso molecular (*Bio-Rad, Hercules, California, USA*) e controle positivo para FN- κ B (lise de células K562) foram simultaneamente avaliados. Posteriormente, as bandas proteicas foram eletroforeticamente transferidas para a membrana de nitrocelulose Immobilon-P (*Millipore Corp Billerica, MA, USA*) por 1h a 100V constante, colocada em caixa de isopor em temperatura ambiente. Deste ponto em diante, kit colorimétrico para Western Blot *ProteoQwestTM* específico para anticorpo monoclonal de rato IgG (Sigma, Oakville, Ontário, Canadá) foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante. Após bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo primário de rato anti- FN- κ B específico numa concentração de 0.5 μ g/ml e 5 μ /ml respectivamente por 18h a 4°C. A coloração foi obtida após incubação com o substrato TMB (*R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA*).

4.15 Ensaio de proliferação in vitro.

O kit de ensaio baseado em Sulforrodamina-B (TOX-6, Sigma-Aldrich) foi utilizado seguindo o protocolo do Instituto Nacional do Câncer dos EUA (Skehan, Storeng et al. 1990). A linhagem celular transfectada de RB foi implantada em poços em uma concentração de $2,5 \times 10^3$ de células por poço, em um mínimo de

6 poços por linhagem celular. A mesma linhagem celular porém não-transfectadas foi usada como controle. Após um período de 48h de incubação, as células foram fixadas ao fundo dos poços utilizando uma solução de 50% de ácido tricloroacético (TCA) por 1h a 4^oC. As placas foram então enxaguadas com água destilada para remover o TCA e o meio, e posteriormente secadas ao ar. Para coloração, a tintura de Sulforodamina-B foi adicionada em cada poço por 25 min. e removida subseqüentemente utilizando-se uma solução de 10% de ácido acético. As placas mais uma vez foram secadas ao ar. A tintura incorporada nas células fixadas no fundo do poço foi solubilizada com uma solução de TRIS 10 μ Mol. A absorvência do soluto foi medida utilizando um leitor de microplatos à onda de luz de 510 μ m. Isto permitiu uma comparação entre as taxas de proliferação das células não-transfectadas em 48 horas comparadas com as taxas de proliferação das células transfectadas durante o mesmo período de tempo.

4.16 Análise estatística

Para verificar possíveis associações entre a expressão de FIH-1- α e os dados clínicos-histopatológicos foi utilizado o teste de Mann Whitney.

As diferentes taxas de proliferação em 2 condições experimentais para cada linhagem de célula de RB foram determinadas, utilizando-se o teste t de Student. O valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente

significante. Os cálculos foram feitos usando-se o programa de computador SPSS, versão 11.5 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

5.0 RESULTADOS

A idade das crianças variou entre 6 meses a 72 meses, com uma média de 24 meses. Nove crianças eram do sexo feminino e 12 do sexo masculino. Treze casos foram localizados no olho direito e 8 no esquerdo. Não houve casos bilaterais.

Os resultados dos dados clínicos e histopatológicos, bem como da imunohistoquímica estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Número e porcentagem de crianças segundo dados clínicos, histopatológicos e imunohistoquímica.

Dados	Nº.	%
Idade		
≤ 12 meses	6	28,6
> 12 meses ≤ 24 meses	9	42,8
> 24 meses	6	28,6
Sexo		
Masculino	12	57,1
Feminino	9	42,9
Olho		
Direito	13	61,9
Esquerdo	8	38,1
Diferenciação		
Boa	2	9,5
Moderada	8	38,1
Pouca	11	52,4
Invasão da câmara anterior		
Sim	5	23,8
Não	16	76,2
Invasão da coróide		
Sim	12	57,1
Não	9	42,9
Invasão do nervo óptico		
Sim	11	52,4

Não	10	47,6
Invasão do vítreo		
Sim	16	76,2
Não	5	23,8
Necrose		
Sim	10	47,6
Não	11	52,4
% de células positivas ao FIH-1- α (escore)		
Negativo (0)	3	14,3
1 a 25% (1)	6	28,6
25 a 50% (2)	2	9,5
50 a 100% (3)	10	47,6
Intensidade de positividade ao FIH-1- α (escore)		
Negativo (0)	3	14,3
Fraca (1)	15	71,4
Moderada (2)	3	14,3
Expressão de FIH-1- α ⁽¹⁾		
0	3	14,3
2	6	28,6
3	1	4,8
4	9	42,9
5	2	9,5

⁽¹⁾ soma dos escores da % de células positivas e da intensidade da positividade.

Dois (9.5%) casos foram classificados como bem diferenciados, 8 (38.1%) como moderadamente e 11 (52.4%) como pouco diferenciados. Cinco (23.8%) casos apresentavam invasão da câmara anterior. Doze (57.1%) casos possuíam invasão da coróide. Onze (52.4%) tinham invasão do nervo óptico além da lâmina crivosa. Dos 21 casos, 18 (85.7%) foram positivos para o FIH-1- α , sendo que 6 (28.6%) foram classificados como 2 pontos (imunohistoquímica total), 1 (4.8%) como 3 pontos, 9 (42.8%) como 4 pontos e 2 (9.5%) casos como 5 pontos.

Houve associação entre a expressão de FIH-1- α e a presença de necrose tumoral ($p = 0,017$). Tumores com mais de 50% de necrose tiveram maior

expressão de FIH-1- α por imunohistoquímica ($p = 0,009$). Também houve associação entre a expressão de FIH-1- α e invasão do vítreo ($p=0.009$). Tumores que apresentaram invasão vítrea apresentaram maior expressão de FIH-1- α . Não houve diferença estatística significativa entre a expressão de FIH-1- α e diferenciação tumoral, invasão do nervo óptico, invasão da câmara anterior ou da coróide.

Tabela 2 – Estatística descritiva dos escores da expressão de FIH-1- α e variáveis de estudo.

Variáveis	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio padrão	<i>p</i>
Diferenciação						
Pouca	0	5	4,0	3,1	1,6	0,57
Boa e moderada	0	4	3,5	2,7	1,6	3
Invasão da câmara anterior						0,16
Sim	2	5	4,0	3,8	1,1	0
Não	0	5	2,5	2,6	1,6	
Invasão da coróide						0,54
Sim	0	4	3,5	2,8	1,5	6
Não	0	5	4,0	3,1	1,7	
Invasão do nervo óptico						0,50
Sim	0	4	4,0	3,1	1,6	4
Não	0	5	2,0	2,7	1,6	
Invasão do vítreo						0,00
Sim	0	5	4,0	3,4	1,3	9
Não	0	2	2,0	1,2	1,1	
Necrose						0,01
Sim	2	5	4,0	3,8	1,0	7
Não	0	4	2,0	2,1	1,6	

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. Teste Mann Whitney.

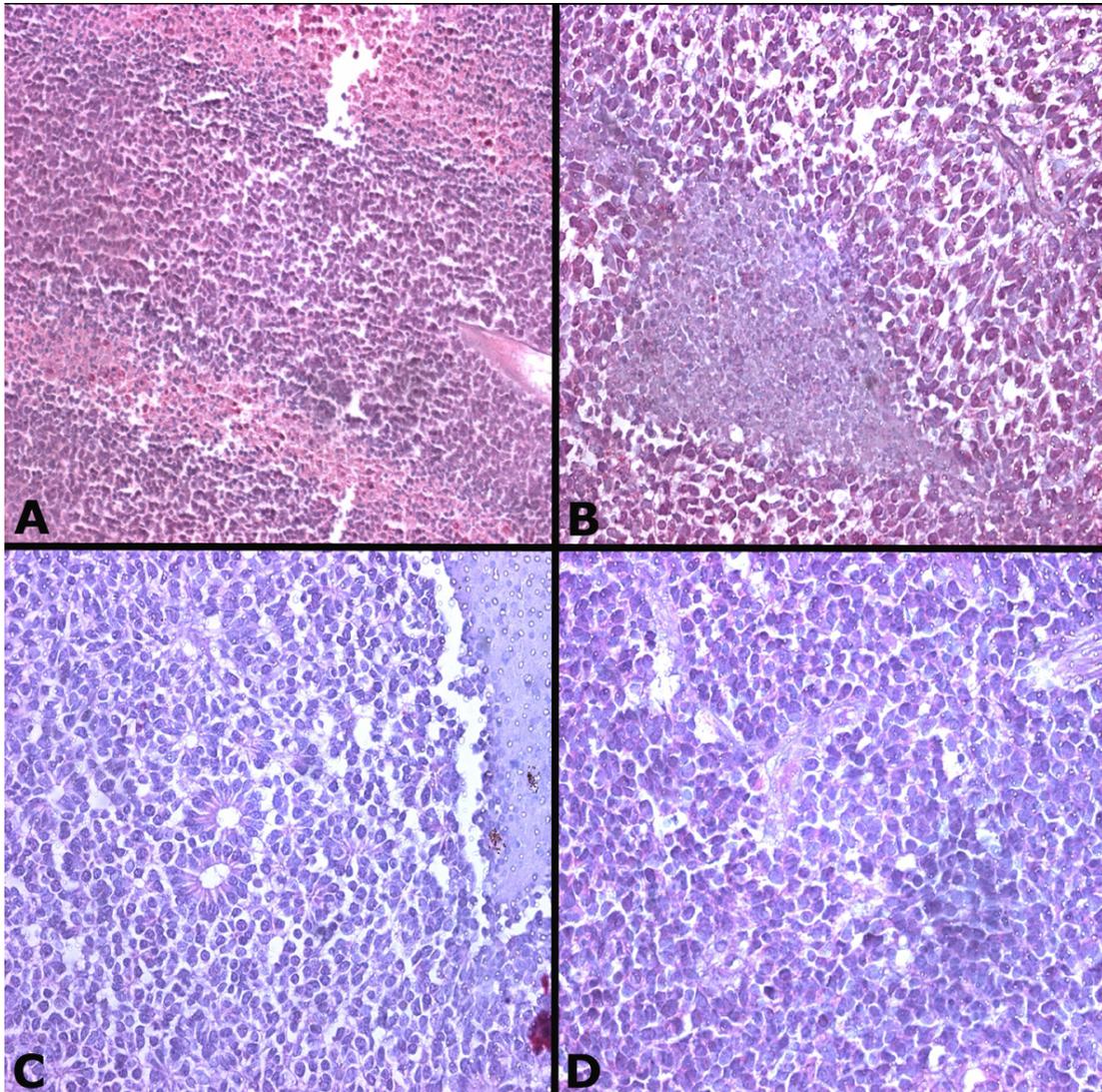
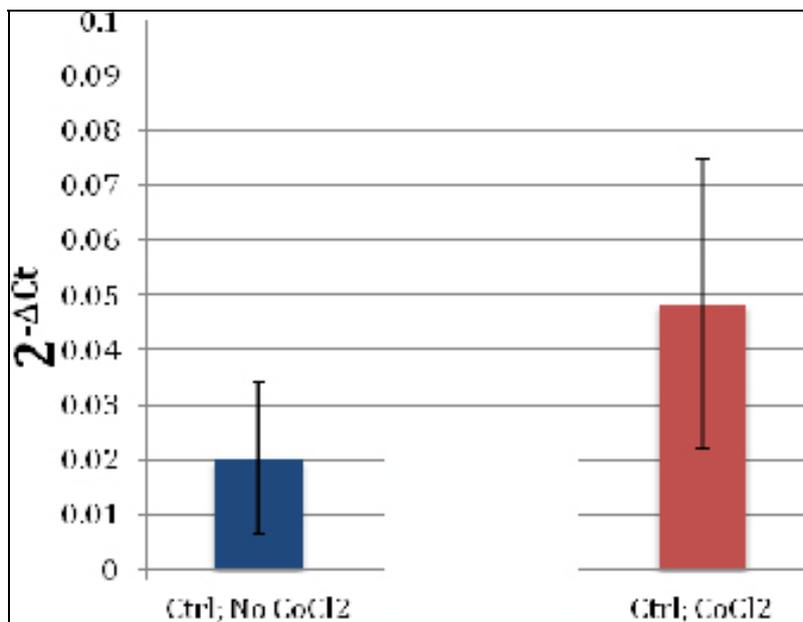


Figura 5 - Fotomicrografias de exemplos de imunohistoquímica por FIH-1- α . A e B) Tumor moderadamente positivo (escore 2, 100x e 400x). C e D) Tumor fracamente positivo (escore 1, 200x e 400x).

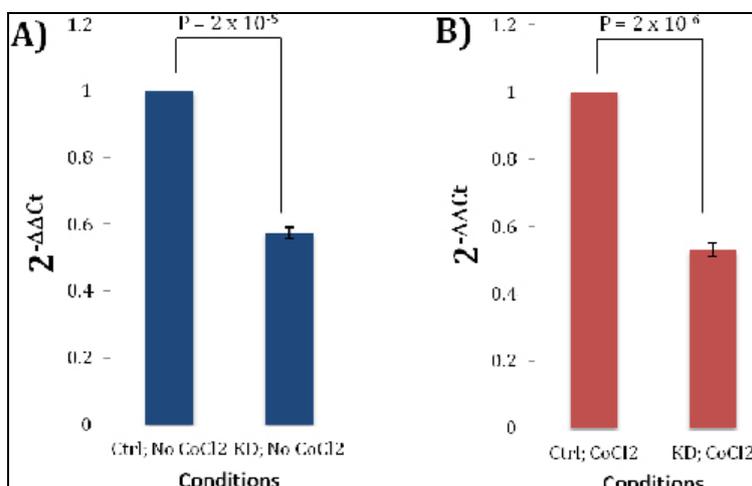
As células de RB Y-79 foram positivas para FIH-1- α por imunocitoquímica.

As células de RB Y-79 foram tratadas com CoCl_2 porque FIH-1- α normalmente é degradada em condições de normóxia 12. CoCl_2 é um composto que estabiliza a proteína FIH-1- α 6,12,14. Os resultados do PCR indicaram que os níveis de RNA de FIH-1- α aumentaram em todas as células de RB tratadas com CoCl_2 (Figura 6), sugerindo que o CoCl_2 está envolvido em induzir a expressão gênica do FIH-1- α .



Ctrl: controle; No CoCl_2 : células não tratadas com CoCl_2 ; CoCl_2 : células tratadas com CoCl_2 .

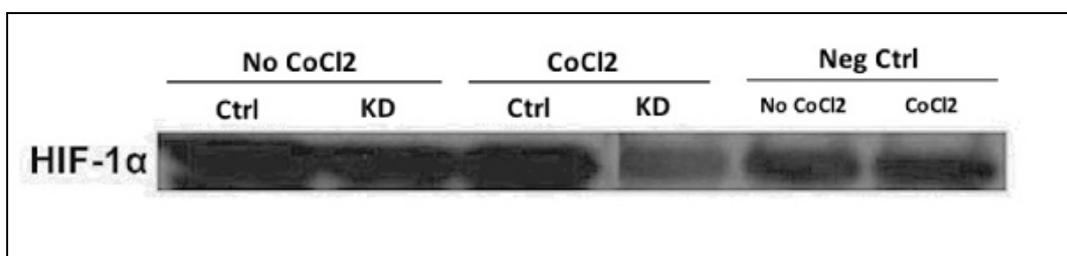
Figura 6 - Quantificação por PCR dos níveis de RNA de FIH-1- α . Em azul, grupo de células não tratadas com CoCl_2 .



Ctrl: controle. No CoCl2: grupo não tratado com CoCl2. KD: “knock down”, células transfectadas com siRNA.

Figura 7 - Quantificação do RNA sem FIH-1- α nos grupos tratados e não tratados com COCl2.

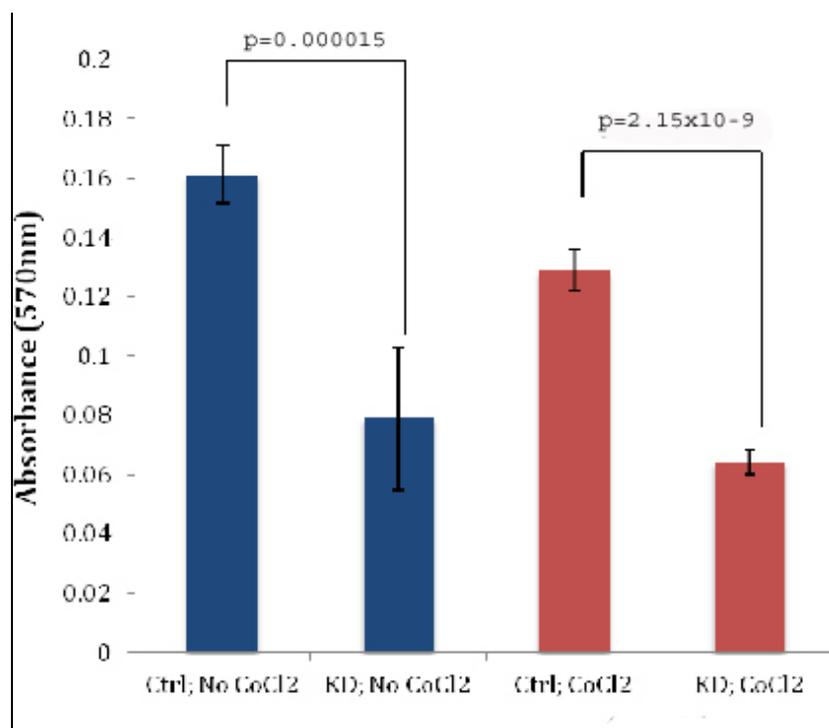
Através do *western blot*, foram analisados os níveis da proteína FIH-1- α em várias condições (Figura 8). Após o silenciamento do gen com siRNA, houve diminuição dos níveis de proteína FIH-1- α nas células tratadas com CoCl2, nas células não tratadas com CoCl2 e no grupo controle.



No CoCl2: células não tratadas com CoCl2. CoCl2: células tratadas com CoCl2. Neg Ctrl: controle negativo.

Figura 8 - Níveis da proteína FIH-1- α em células sem CoCl2, com CoCl2 e no grupo controle, através do *western blot*.

Para verificar o efeito do bloqueio do gen FIH-1- α na proliferação das células de RB, foi realizado o ensaio de invasão MTT nas células transfectadas com siRNA, tratadas e não tratadas com CoCl₂, e comparado ao grupo controle. Houve uma diminuição significativa na taxa de proliferação das células de RB Y-79 tratadas ($p = 2.15 \times 10^{-9}$) e não tratadas ($p = 0.000015$) com CoCl₂, quando comparadas aos respectivos grupos controles (Figura 9). Estes resultados sugerem que FIH-1- α está envolvido na proliferação das células de RB Y-79.



Ctrl: controle. No CoCl₂: grupo não tratado com CoCl₂. KD: "knock down", células transfectadas com siRNA.

Figura 9 - Gráfico mostrando o ensaio de proliferação MTT.

6.0 DISCUSSÃO

Hipóxia é definida com uma redução na quantidade de O₂ para a célula, tecido ou organismo. A diminuição nos níveis de O₂ pode causar alteração na transcrição gênica ou pode resultar em alteração nas proteínas pós-translacionais, resultando mudanças no metabolismo celular (Loboda et al., 2010).

A hipóxia é um fenômeno comum que ocorre na maioria dos tumores sólidos humanos (Li et al., 2008). O microambiente do tumor é diferente de um tecido normal por causa do *status* proliferativo das células tumorais e do suprimento vascular irregular que resulta em hipóxia (Wouters & Koritzinsky, 2008; Zhang et al., 2008).

As células em hipóxia ficam em risco de insultos *stress*-induzidos, incluindo dano oxidativo ao DNA, quebras nas hélices de DNA e aberrações genéticas, que podem frear o crescimento tumoral e levar à morte celular. Porém, as células cancerígenas mostram uma variedade de alterações genéticas que aumentam a sua sobrevivência, permitindo-lhes adaptarem-se às condições de hipóxia. Como resultado, as células cancerígenas hipóxicas continuam a se proliferar, e estão associadas a um fenótipo mais invasivo e metastático e são usualmente resistentes a tratamentos convencionais, como quimioterapia e radioterapia (Hockel & Vaupel, 2001; Poon et al., 2009).

De fato, os principais efeitos da hipóxia nas células tumorais são: seleção de genótipos capazes de sobreviver em estados de injúria devido à hipóxia e re-oxigenação (como mutação TP53), alterações na expressão gênica que suprime a apoptose (Erler et al., 2004) e suporta a autofagia (Rouschop et al., 2010), e a troca anabólica do metabolismo central (Cairns et al., 2011). A hipóxia aumenta a sinalização mediada pelos receptores de tirosina-quinase (Wang & Ohh, 2010), angiogênese tumoral, vasculogênese (Kioi et al., 2010), transição mesenquimal-epitelial (Hill et al., 2009), invasividade e metástase (Chang et al., 2011), além de suprimir a imunoreatividade (Yotnda et al., 2010). Além disto, a hipóxia contribui para a perda da estabilidade genômica através do aumento da produção de espécies de oxigênio reativas e diminuição da regulação de vias de reparação do DNA (Bristow & Hill, 2008).

As células e os tecidos tumorais adaptam-se ao microambiente hipóxico através da ativação de várias vias e moléculas associadas à hipóxia. Destas, o FIH-1- α é o fator de transcrição mais importante que regula a resposta celular à hipóxia (Kizaka-Kondoh et al., 2011).

FIH-1- α é super-expressa em cânceres comuns e contribui para o crescimento tumoral e angiogênese (Garcia-Maceira & Mateo, 2009).

O RB representa um dos tumores malignos mais frequentes na infância e afeta 1 em 15.000 nascidos vivos (Pendergrass & Davis, 1980; Tamboli et al., 1990). Apesar da existência de quimioterapia moderna, tumores avançados são, em geral, quimioresistentes e as taxas de cura são baixas, além da quimiotoxicidade e efeitos colaterais como supressão de medula óssea,

possibilidade de outras neoplasias, incluindo leucemia. Em pacientes com tumores avançados (grupo D da classificação internacional), 77% respondem mal ao tratamento. Falha no tratamento quimioterápico requer radioterapia e/ou enucleação (Chan et al., 2005).

As células do RB em hipóxia sobrevivem em condições de baixa tensão de O₂, o que ocorre geralmente em estados avançados do tumor (Boutrid et al., 2008). Tem sido demonstrado que estas células são resistentes à quimioterapia e radioterapia que, especificamente, afetam células em alta taxa de proliferação (Maschek et al., 2004). Células tumorais em hipóxia, portanto, podem não responder a estes tipos de tratamento convencionais (Boutrid et al., 2008; Boutrid et al., 2009).

Demonstra-se que a grande maioria dos tumores da amostra são positivos para FIH-1- α através da imunohistoquímica. De fato, o RB é um tumor que possui, caracteristicamente, calcificação, que, por sua vez, está diretamente relacionada à necrose tumoral (Levy et al., 2011). Observou-se neste estudo, uma correlação estatística significativa entre necrose e expressão de FIH-1- α . RB com mais de 50% de necrose expressa mais FIH-1- α . Porém não achou-se correlação significativa entre a expressão de FIH-1- α e outros fatores prognósticos histopatológicos. De fato, a presença de extensa necrose em RB está associada a tumores poucos diferenciados, que por sua vez estão associados a outros fatores histopatológicos de pior prognóstico (Kashyap et al., 2012). O baixo número de casos deste trabalho pode ter contribuído para a não

correlação entre expressão de FIH-1- α e outros fatores prognósticos histopatológicos.

Apesar do RB ser um tumor altamente vascularizado, um estudo recente demonstrou que, após um certo tamanho ou estágio de desenvolvimento do tumor, a demanda metabólica excede o suprimento vascular, resultando em áreas de hipóxia (Boutrid et al., 2008). Na verdade, este achado já foi demonstrado por Burnier e col. em 1990 com a observação da relação entre as células de RB viáveis e os vasos sanguíneos (Burnier et al., 1990).

Obsevou-se que o bloqueio do gen FIH-1- α através do método de siRNA diminui a proliferação das células de RB. Isto é um achado bastante importante, pois indica que uma das vias de proliferação deste tumor pode estar relacionada a FIH-1- α . Este dado aponta para uma nova opção de tratamento para o RB, principalmente nos casos avançados em que os tratamentos convencionais como radioterapia e quimioterapia não são muito eficientes (Boutrid et al., 2009). De fato, um trabalho recente demonstrou que o uso de agentes bloqueadores da via de sinalização intracelular mTOR, como a rapamicina, diminui a carga tumoral bem como a hipóxia dentro do tumor (Pina et al., 2011). O mTOR, por sua vez, está diretamente relacionado a FIH-1- α , regulando-a em sua cascata de sinalização intracelular (Toschi et al., 2010).

Recentemente, diversas drogas foram desenvolvidas para o bloqueio da via de sinalização de hipóxia. Apesar de nenhuma delas ter sido aprovada para uso clínico, diversas estão em fase de experimento em ensaios clínicos como EO9, CB1954, RP104, tirapazamine (TPZ) e AQ4N (Chen & Hu, 2009). Em um estudo

piloto recente, o inibidor de FIH-1- α topotecan foi administrado oralmente a 16 pacientes com câncer avançado. Diminuição nos níveis de RNAm de VEGF e GLUT-1, 2 proteínas associadas à metastase e progressão tumoral, foi observada em 4 pacientes. Além disto, em 7 de 10 pacientes foi observada diminuição de fluxo sanguíneo tumoral (Kummar et al., 2011).

Ainda existem muitos desafios na utilização de drogas contra as células em hipóxia. Um dos principais é a potencial toxicidade em tecidos normais. Além disto, o desenvolvimento clínico de todas as drogas contra as células tumorais em hipóxia é limitado pela falta de conhecimento sobre as taxas de falência no tratamento devido à hipóxia. Um desafio adicional é a falta de conhecimento dos próprios oncologistas radioterapeutas que atuam na área onde a hipóxia é mais claramente entendida (Wilson & Hay, 2011).

A terapia contra a vascularização tumoral (ex. VEGF) tem sido estudada em diversos tumores. Este tipo de terapia é o oposto da terapia em áreas hipóxicas. Entretanto, é possível que a terapia da vascularização tumoral possa levar à seleção de células hipóxicas dentro do tumor. Sendo assim, a combinação de drogas contra as áreas hipóxicas (ex. Inibidores glicolíticos) com a terapia contra a vascularização tumoral poderia ser muito eficiente, principalmente nos casos avançados de RB e em outros tumores nos quais as terapias adjuvantes têm falhado por causa, possivelmente, da alta taxa de hipóxia intratumoral (Boutrid et al., 2008). Além disto, foi recentemente provado que grande parte dos RB expressam VEGF (Arean et al., 2010).

Em resumo, foi demonstrado que grande parte dos RB expressam FIH-1- α , a principal proteína relacionada à hipoxia, e que esta expressão corresponde à necrose tumoral. A inibição do gen da FIH-1- α diminui a proliferação em células de RB, indicando uma possível nova estratégia para tratamento deste tumor, principalmente nos casos avançados onde existe muita hipóxia e os tratamentos convencionais não são eficientes.

7.0 CONCLUSÕES

A) Demonstrou-se que a grande maioria dos RB expressa FIH-1- α e que esta expressão correlaciona-se com a necrose tumoral. Não houve correlação entre a expressão de FIH-1- α com outros fatores prognósticos histopatológicos importantes como invasão do nervo óptico.

B) As células de RB expostas ao CoCL2 apresentaram níveis maiores de FIH-1- α quando comparadas com as células não expostas (grupo controle).

C) Após o silenciamento do gen FIH-1- α com siRNA, houve uma diminuição da quantidade de RNA de FIH-1- α tanto nas células expostas quanto nas não expostas ao CoCL2.

D) Tanto as células que foram expostas ao CoCl2 quanto as que não foram expostas tiveram uma proliferação significativamente menor que as células do grupo controle, após o bloqueio do gen FIH-1- α .

REFERÊNCIAS

- Abramson DH, Mendelsohn ME, Servodidio CA, Tretter T, Gombos DS. (1998). Familial retinoblastoma: where and when? *Acta Ophthalmol Scand*, **76**, 334-8.
- Abramson, D.H., Beaverson, K., Sangani, P., Vora, R.A., Lee, T.C., Hochberg, H.M., Kirsztrot, J. & Ranjithan, M. (2003). Screening for retinoblastoma: presenting signs as prognosticators of patient and ocular survival. *Pediatrics*, **112**, 1248-55.
- Abramson, D.H., Frank, C.M. (1998). Second nonocular tumors in survivors of bilateral retinoblastoma: a possible age effect on radiation-related risk. *Ophthalmology*, **105**, 573-9.
- Abreu, A.A., Ventura, L.O., Abreu, S.S., Regis, L., Moraes, V., Calheiros, L.M.C. (1999) Epidemiologic Study of Retinoblastoma no Recife, Pernambuco, Brasil: janeiro 1985 - julho 1997. *Arq Bras Oftalmol*, **62**, 614-9
- Ahn, G.O. & Brown, M. (2007). Targeting tumors with hypoxia-activated cytotoxins. *Front Biosci*, **12**, 3483-501.
- Albert, D.M. (1987). Historic review of retinoblastoma. *Ophthalmology*, **94**, 654-62.
- Antoneli, C.B., Steinhorst, F., de Cassia Braga Ribeiro, K., Novaes, P.E., Chojniak, M.M., Arias, V. & de Camargo, B. (2003). Extraocular retinoblastoma: a 13-year experience. *Cancer*, **98**, 1292-8.

- Arean, C., Orellana, M.E., Abourbih, D., Abreu, C., Pifano, I. & Burnier, M.N., Jr. (2010). Expression of vascular endothelial growth factor in retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, **128**, 223-9.
- Balasubramanya, R., Pushker, N., Bajaj, M.S., Ghose, S., Kashyap, S. & Rani, A. (2004). Atypical presentations of retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, **41**, 18-24.
- Bárdos, J.I., Ashcroft, M. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays*, **26**, 262-9.
- Bastien, L., Culine, S., Paule, B., Ledbai, S., Patard, J.J. & de la Taille, A. (2009). Targeted therapies in metastatic renal cancer in 2009. *BJU Int*, **103**, 1334-42.
- Bertout, J.A., Patel, S.A. & Simon, M.C. (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*, **8**, 967-75.
- Biswas, S., Troy, H., Leek, R., Chung, Y.L., Li, J.L., Raval, R.R., Turley, H., Gatter, K., Pezzella, F., Griffiths, J.R., Stubbs, M. & Harris, A.L. (2010). Effects of HIF-1 α and HIF2 α on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts. *J Oncol*, **2010**, 757908.
- Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C.F., Mommers, E.C., Semenza, G.L., Pinedo, H.M., Abeloff, M.D., Simons, J.W., van Diest, P.J., van der Wall, E. (2001). Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, **21**, **93**, 309-14.

- Boutrid, H., Jockovich, M.E., Murray, T.G., Pina, Y., Feuer, W.J., Lampidis, T.J. & Cebulla, C.M. (2008). Targeting hypoxia, a novel treatment for advanced retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **49**, 2799-805.
- Boutrid, H., Pina, Y., Cebulla, C.M., Feuer, W.J., Lampidis, T.J., Jockovich, M.E. & Murray, T.G. (2009). Increased hypoxia following vessel targeting in a murine model of retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50**, 5537-43.
- Bristow, R.G. & Hill, R.P. (2008). Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*, **8**, 180-92.
- Brown, J.M. & Wilson, W.R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, **4**, 437-47.
- Burnier, M.N., McLean, I.W., Zimmerman, L.E. & Rosenberg, S.H. (1990). Retinoblastoma. The relationship of proliferating cells to blood vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **31**, 2037-40.
- Carbajal, U.M. (1958). Observations on retinoblastoma. *Am J Ophthalmol*, **45**, 391-402.
- Cairns, R.A., Harris, I.S. & Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, **11**, 85-95.
- Carroll, V.A., Ashcroft, M. (2006). Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res.*, **66**, 6264-70.

- Cerecedo Diaz, F., Lopez Aguilar, E., Rivera Marquez, H., Arias Gomez, J., Ramirez Santarita, F. & Rodriguez Cruz, M. (2003). [Survival and clinical features of retinoblastoma]. *An Pediatr (Barc)*, **58**, 3-9.
- Chan, H.S., Gallie, B.L., Munier, F.L. & Beck Popovic, M. (2005). Chemotherapy for retinoblastoma. *Ophthalmol Clin North Am*, **18**, 55-63, viii.
- Chang, Q., Jurisica, I., Do, T. & Hedley, D.W. (2011). Hypoxia predicts aggressive growth and spontaneous metastasis formation from orthotopically grown primary xenografts of human pancreatic cancer. *Cancer Res*, **qa**, 3110-20.
- Chantada, G., Fandino, A., Casak, S., Manzitti, J., Raslawski, E. & Schwartzman, E. (2003). Treatment of overt extraocular retinoblastoma. *Med Pediatr Oncol*, **40**, 158-61.
- Chen, J., Zhao, S., Nakada, K., Kuge, Y., Tamaki, N., Okada, F., Wang, J., Shindo, M., Higashino, F., Takeda, K., Asaka, M., Katoh, H., Sugiyama, T., Hosokawa, M. & Kobayashi, M. (2003). Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. *Am J Pathol*, **162**, 1283-91.
- Chen, Y. & Hu, L. (2009). Design of anticancer prodrugs for reductive activation. *Med Res Rev*, **29**, 29-64.
- Choi, H.J., Song, B.J., Gong, Y.D., Gwak, W.J. & Soh, Y. (2008). Rapid degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha by KRH102053, a new activator of prolyl hydroxylase 2. *Br J Pharmacol*, **154**, 114-25.

- Dang, C.V., Le, A. & Gao, P. (2009). MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res*, **15**, 6479-83.
- Deegan, W.F. (2003). Emerging strategies for the treatment of retinoblastoma. *Curr Opin Ophthalmol*, **14**, 291-5.
- Dewhirst, M.W. (2009). Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiat Res*, **172**, 653-65.
- Dondey, J.C., Staffieri, S., McKenzie, J., Davie, G. & Elder, J. (2004). Retinoblastoma in Victoria, 1976-2000: changing management trends and outcomes. *Clin Experiment Ophthalmol*, **32**, 354-9.
- Draper, G.J., Sanders, B.M. & Kingston, J.E. (1986). Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer*, **53**, 661-71.
- Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegue, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R.S., Werb, Z. & Bergers, G. (2008). HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*, **13**, 206-20.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.T. & Giaccia, A.J. (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*, **15**, 35-44.
- Erler, J.T., Cawthorne, C.J., Williams, K.J., Koritzinsky, M., Wouters, B.G., Wilson, C., Miller, C., Demonacos, C., Stratford, I.J. & Dive, C. (2004). Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via

- hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol*, **24**, 2875-89.
- Erwenne, C.M. & Franco, E.L. (1989). Age and lateness of referral as determinants of extra-ocular retinoblastoma. *Ophthalmic Paediatr Genet*, **10**, 179-84.
- Fernandes P.M., Marback E.F., Sé D.C.S., Marback R.L. (1998). Enucleação ocular em crianças no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos. *Rev Bras Oftalmol.*, **57**, 281-4.
- Fillies, T., Werkmeister, R., van Diest, P.J., Brandt, B., Joos, U. & Buerger, H. (2005). HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer*, **5**, 84.
- Friedman, D.L., Himelstein, B., Shields, C.L., Shields, J.A., Needle, M., Miller, D., Bunin, G.R. & Meadows, A.T. (2000). Chemoreduction and local ophthalmic therapy for intraocular retinoblastoma. *J Clin Oncol*, **18**, 12-7.
- Galban, S. & Gorospe, M. (2009). Factors interacting with HIF-1alpha mRNA: novel therapeutic targets. *Curr Pharm Des*, **15**, 3853-60.
- Gallie BL, Dunn JM, Chan HS, Hamel PA, Phillips RA. (1991). The genetics of retinoblastoma. Relevance to the patient. *Pediatr Clin North Am*, **38**, 299-315.
- Garcia-Maceira, P. & Mateo, J. (2009). Silibinin inhibits hypoxia-inducible factor-1alpha and mTOR/p70S6K/4E-BP1 signalling pathway in human cervical and hepatoma cancer cells: implications for anticancer therapy. *Oncogene*, **28**, 313-24.

- Goddard, A.G., Kingston, J.E. & Hungerford, J.L. (1999). Delay in diagnosis of retinoblastoma: risk factors and treatment outcome. *Br J Ophthalmol*, **83**, 1320-3.
- Gottesman, M.M., Fojo, T. & Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, **2**, 48-58.
- Gruber, G., Greiner, R.H., Hlushchuk, R., Aebbersold, D.M., Altermatt, H.J., Berclaz, G. & Djonov, V. (2004). Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res*, **6**, R191-8.
- Hadjistilianou, T., Mastrangelo, D., De Francesco, S. & Mazzotta, C. (2002). Brief report: conservative treatment in unilateral retinoblastoma: a preliminary report. *Med Pediatr Oncol*, **38**, 439-41.
- Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Riordan, M.V., Tian, Y.M., Bullock, A.N., Welford, R.W., Elkins, J.M., Oldham, N.J., Bhattacharya, S., Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W., Schofield, C.J. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem*, **277**, 26351-5.
- Hill, R.P., Marie-Egyptienne, D.T. & Hedley, D.W. (2009). Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. *Semin Radiat Oncol*, **19**, 106-11.
- Hockel, M. & Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 266-76.

- Jaakkola P., Mole D.R., et al. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-72.
- Kaelin, W.G., Jr. & Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, **30**, 393-402.
- Kashyap, S., Sethi, S., Meel, R., Pushker, N., Sen, S., Bajaj, M.S., Chandra, M. & Ghose, S. (2012). A histopathologic analysis of eyes primarily enucleated for advanced intraocular retinoblastoma from a developing country. *Arch Pathol Lab Med*, **136**, 190-3.
- Ke, H.L., Wei, Y.C., Yang, S.F., Li, C.C., Wu, D.C., Huang, C.H. & Wu, W.J. (2008). Overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha predicts an unfavorable outcome in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Int J Urol*, **15**, 200-5.
- Khelifaoui, F., Validire, P., Auperin, A., Quintana, E., Michon, J., Pacquement, H., Desjardins, L., Asselain, B., Schlienger, P., Vielh, P. & et al. (1996). Histopathologic risk factors in retinoblastoma: a retrospective study of 172 patients treated in a single institution. *Cancer*, **77**, 1206-13.
- Kioi, M., Vogel, H., Schultz, G., Hoffman, R.M., Harsh, G.R. & Brown, J.M. (2010). Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest*, **120**, 694-705.

- Kivela, T. (1999). Trilateral retinoblastoma: a meta-analysis of hereditary retinoblastoma associated with primary ectopic intracranial retinoblastoma. *J Clin Oncol*, **17**, 1829-37.
- Kivela, T. & Polkunen, M.L. (2003). Pieter Pauw's tumor oculorum: reappraisal of the presumed first description of retinoblastoma in 1597. *Arch Ophthalmol*, **121**, 881-6.
- Kizaka-Kondoh, S. & Konse-Nagasawa, H. (2009). Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer Sci*, **100**, 1366-73.
- Kizaka-Kondoh, S., Kuchimaru, T. & Kadonosono, T. (2011). Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)-active cells as a target for cancer therapy. *J Pharmacol Sci*, **115**, 440-5.
- Klatte, T., Seligson, D.B., Riggs, S.B., Leppert, J.T., Berkman, M.K., Kleid, M.D., Yu, H., Kabbinavar, F.F., Pantuck, A.J. & Belldegrun, A.S. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **13**, 7388-93.
- Knudson A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-3.
- Kopelman, J.E., McLean, I.W. & Rosenberg, S.H. (1987). Multivariate analysis of risk factors for metastasis in retinoblastoma treated by enucleation. *Ophthalmology*, **94**, 371-7.

- Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I., Plate, K.H. (2000). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene*, **19**, 5435-43.
- Kronbauer, F.L., Corrêa, Z.M., Tyllmann, C., Escovar, C.E., Marcon, I.M. (2000) O uso da quimioterapia no tratamento do retinoblastoma: Avaliação retrospectiva. *Arq Bras Oftalmol*, **63**, 481-6.
- Kummar, S., Raffeld, M., Juwara, L., Horneffer, Y., Strassberger, A., Allen, D., Steinberg, S.M., Rapisarda, A., Spencer, S.D., Figg, W.D., Chen, X., Turkbey, I.B., Choyke, P., Murgu, A.J., Doroshow, J.H. & Melillo, G. (2011). Multihistology, target-driven pilot trial of oral topotecan as an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha in advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, **17**, 5123-31.
- Levy, J., Frenkel, S., Baras, M., Neufeld, M. & Pe'er, J. (2011). Calcification in retinoblastoma: histopathologic findings and statistical analysis of 302 cases. *Br J Ophthalmol*, **95**, 1145-50.
- Li, S.H., Shin, D.H., Chun, Y.S., Lee, M.K., Kim, M.S. & Park, J.W. (2008). A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1{alpha}. *Mol Cancer Ther*, **7**, 3729-38.
- Lira, R.P.C., Leoncio, M., Pinho, J., Rocha, G., Lira. P.C (1995). Retinoblastoma extraocular: estudo de 37 casos. *Arq Bras Oftalmol*, **58**, 480-3.

- Loboda, A., Jozkowicz, A. & Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells*, **29**, 435-42.
- Magrann, I., Abramson, D.H. & Ellsworth, R.M. (1989). Optic nerve involvement in retinoblastoma. *Ophthalmology*, **96**, 217-22.
- Majmundar, A.J., Wong, W.J. & Simon, M.C. (2011). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, **40**, 294-309.
- Mak, P., Leav, I., Pursell, B., Bae, D., Yang, X., Taglienti, C.A., Gouvin, L.M., Sharma, V.M. & Mercurio, A.M. (2010). ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell*, **17**, 319-32.
- Makino, Y., Uenishi, R., Okamoto, K., Isoe, T., Hosono, O., Tanaka, H., Kanopka, A., Poellinger, L., Haneda, M., Morimoto, C. (2007). Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem.*, **282**, 14073-82.
- Maschek, G., Savaraj, N., Priebe, W., Braunschweiger, P., Hamilton, K., Tidmarsh, G.F., De Young, L.R. & Lampidis, T.J. (2004). 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res*, **64**, 31-4.

Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-5.

Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **94**, 8104-9.

McLean, I.W., Armed Forces Institute of Pathology (U.S.) & Universities Associated for Research and Education in Pathology Inc. (1994). *Tumors of the eye and ocular adnexa*. Armed Forces Institute of Pathology; under the auspices of Universities Associated for Research and Education in Pathology Inc.: Washington, D.C. Bethesda, MD.

Melillo, G. (2007). Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*, **26**, 341-52.

Messmer, E.P., Heinrich, T., Hopping, W., de Sutter, E., Havers, W., Sauerwein, W. (1991). Risk factors for metastases in patients with retinoblastoma. *Ophthalmology*, **98**, 136-41.

Miyake, K., Yoshizumi, T., Imura, S., Sugimoto, K., Batmunkh, E., Kanemura, H., Morine, Y. & Shimada, M. (2008). Expression of hypoxia-inducible factor-1 α , histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in

- pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. *Pancreas*, **36**, e1-9.
- Nagasawa, H. (2011). Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: drug discovery for targeting the tumor microenvironment. *J Pharmacol Sci*, **115**, 446-52.
- Nagasawa, H., Mikamo, N., Nakajima, Y., Matsumoto, H., Uto, Y. & Hori, H. (2003). Antiangiogenic hypoxic cytotoxin TX-402 inhibits hypoxia-inducible factor 1 signaling pathway. *Anticancer Res*, **23**, 4427-34.
- Nagasawa, H., Uto, Y., Kirk, K.L. & Hori, H. (2006). Design of hypoxia-targeting drugs as new cancer chemotherapeutics. *Biol Pharm Bull*, **29**, 2335-42.
- Narod, S.A., Stiller, C. & Lenoir, G.M. (1991). An estimate of the heritable fraction of childhood cancer. *Br J Cancer*, **63**, 993-9.
- Onnis, B., Rapisarda, A. & Melillo, G. (2009). Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *J Cell Mol Med*, **13**, 2780-6.
- Osada, R., Horiuchi, A., Kikuchi, N., Yoshida, J., Hayashi, A., Ota, M., Katsuyama, Y., Melillo, G. & Konishi, I. (2007). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha, hypoxia-inducible factor 2alpha, and von Hippel-Lindau protein in epithelial ovarian neoplasms and allelic loss of von Hippel-Lindau gene: nuclear expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma. *Hum Pathol*, **38**, 1310-20.
- Parkin, D.M., Stiller, C.A., Draper, G.J. & Bieber, C.A. (1988). The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer*, **42**, 511-20.

- Pendergrass, T.W. & Davis, S. (1980). Incidence of retinoblastoma in the United States. *Arch Ophthalmol*, **98**, 1204-10.
- Pérez Samatier, C., Travezán Carvo, R., Salem Abugattas, L.E., Garcia, J. (1989) Retinoblastoma: estudio histopatológico de 230 casos. *Acta cancerol*, 20, 5-10.
- Pietras, A., Hansford, L.M., Johnsson, A.S., Bridges, E., Sjolund, J., Gisselsson, D., Rehn, M., Beckman, S., Noguera, R., Navarro, S., Cammenga, J., Fredlund, E., Kaplan, D.R. & Pahlman, S. (2009). HIF-2alpha maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16805-10.
- Pina, Y., Decatur, C., Murray, T., Houston, S., Gologorsky, D., Cavalcante, M., Cavalcante, L., Hernandez, E., Celdran, M., Feuer, W. & Lampidis, T. (2011). Advanced retinoblastoma treatment: targeting hypoxia by inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in LH(BETA)T(AG) retinal tumors. *Clin Ophthalmol*, **5**, 337-43.
- Pollard, P.J., Brière, J.J., Alam, N.A., Barwell, J., Barclay, E., Wortham, N.C., Hunt, T., Mitchell, M., Olpin, S., Moat, S.J., Hargreaves, I.P., Heales, S.J., Chung, Y.L., Griffiths, J.R., Dalglish, A., McGrath, J.A., Gleeson, M.J., Hodgson, S.V., Poulson, R., Rustin, P., Tomlinson, I.P. (2005). Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet.*, **14**, 2231-9.

- Poon, E., Harris, A.L. & Ashcroft, M. (2009). Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev Mol Med*, **11**, e26.
- Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Scudiero, D.A., Selby, M., Sausville, E.A., Shoemaker, R.H. & Melillo, G. (2002). Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res*, **62**, 4316-24.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*, **25**, 5675-86.
- Redler, L.D. & Ellsworth, R.M. (1973). Prognostic importance of choroidal invasion in retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, **90**, 294-6.
- Reese, A.B. (1963). *Tumors of the eye*. Hoeber: New York.
- Reese, A.B. & Ellsworth, R.M. (1963). The evaluation and current concept of retinoblastoma therapy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, **67**, 164-72.
- Remmele, W. & Stegner, H.E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, **8**, 138-40.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-4.

- Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., Lambin, P., van der Kogel, A.J., Koritzinsky, M. & Wouters, B.G. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest*, **120**, 127-41.
- Rubin, C.M., Robison, L.L., Cameron, J.D., Woods, W.G., Nesbit, M.E., Jr., Krivit, W., Kim, T.H., Letson, R.D. & Ramsay, N.K. (1985). Intraocular retinoblastoma group V: an analysis of prognostic factors. *J Clin Oncol*, **3**, 680-5.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 721-32.
- Shields, C.L., Honavar, S.G., Meadows, A.T., Shields, J.A., Demirci, H. & Naduvilath, T.J. (2002). Chemoreduction for unilateral retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, **120**, 1653-8.
- Shields, C.L., Shields, J.A., Cater, J., Othmane, I., Singh, A.D., Micaely, B. (2001). Plaque radiotherapy for retinoblastoma: long-term tumor control and treatment complications in 208 tumors. *Ophthalmology*, **108**, 2116-21.
- Shields, C.L., Meadows, A.T., Shields, J.A., Carvalho, C., Smith, A.F. (2001). Chemoreduction for retinoblastoma may prevent intracranial neuroblastic malignancy (trilateral retinoblastoma). *Arch Ophthalmol*, **119**, 1269-72.

- Shields C.L., Shields J.A., Meadows A.T. (2000). Chemoreduction for retinoblastoma may prevent trilateral retinoblastoma. *J Clin Oncol*, **18**, 236-7.
- Shields, C.L., Shields, J.A. (1999). Recent developments in the management of retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, **36**, 8-18.
- Shields, C.L., Santos, M.C., Diniz, W., Gunduz, K., Mercado, G., Cater, J.R. & Shields, J.A. (1999). Thermotherapy for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, **117**, 885-93.
- Shields, C.L., Shields, J.A., Baez, K.A., Cater, J. & De Potter, P.V. (1993). Choroidal invasion of retinoblastoma: metastatic potential and clinical risk factors. *Br J Ophthalmol*, **77**, 544-8.
- Singh, A.D., Shields, C.L. & Shields, J.A. (2000). Prognostic factors in retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, **37**, 134-41; quiz 168-9.
- Spencer, W.H., American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology. & Armed Forces Institute of Pathology (U.S.). (1985). *Ophthalmic pathology, an atlas and textbook*. Saunders: Philadelphia.
- Staab, A., Loeffler, J., Said, H.M., Diehlmann, D., Katzer, A., Beyer, M., Fleischer, M., Schwab, F., Baier, K., Einsele, H., Flentje, M., Vordermark, D. (2007). Effects of HIF-1 inhibition by chetomin on hypoxia-related transcription and radiosensitivity in HT 1080 human fibrosarcoma cells. *BMC Cancer*, **13**, 7:213.

- Stannard, C., Lipper, S., Sealy, R., Sevel, D. (1979). Retinoblastoma: correlation of invasion of the optic nerve and choroid with prognosis and metastases. *Br J Ophthalmol*, **63**, 560-70.
- Stockmann, C., Doedens, A., Weidemann, A., Zhang, N., Takeda, N., Greenberg, J.I., Cheresch, D.A. & Johnson, R.S. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*, **456**, 814-8.
- Sumiyoshi, Y., Kakeji, Y., Egashira, A., Mizokami, K., Orita, H. & Maehara, Y. (2006). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, **12**, 5112-7.
- Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. & Harris, A.L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*, **157**, 411-21.
- Tamboli, A., Podgor, M.J. & Horm, J.W. (1990). The incidence of retinoblastoma in the United States: 1974 through 1985. *Arch Ophthalmol*, **108**, 128-32.
- Thomas, H. & Coley, H.M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*, **10**, 159-65.
- Toschi, A., Lee, E., Thompson, S., Gadir, N., Yellen, P., Drain, C.M., Ohh, M. & Foster, D.A. (2010). Phospholipase D-mTOR requirement for the Warburg effect in human cancer cells. *Cancer Lett*, **299**, 72-9.

- Ts'o, M.O., Fine, B.S. & Zimmerman, L.E. (1969). The Flexner-Wintersteiner rosettes in retinoblastoma. *Arch Pathol*, **88**, 664-71.
- Ts'o, M.O., Zimmerman, L.E., Fine, B.S. & Ellsworth, R.M. (1970). A cause of radioresistance in retinoblastoma: photoreceptor differentiation. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, **74**, 959-69.
- Uusitalo, M.S., Van Quill, K.R., Scott, I.U., Matthay, K.K., Murray, T.G. & O'Brien, J.M. (2001). Evaluation of chemoprophylaxis in patients with unilateral retinoblastoma with high-risk features on histopathologic examination. *Arch Ophthalmol*, **119**, 41-8.
- Vaupel, P., Hockel, M. & Mayer, A. (2007). Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal*, **9**, 1221-35.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. & Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5510-4.
- Wang, G.L. & Semenza, G.L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4304-8.
- Wang, Y. & Ohh, M. Oxygen-mediated endocytosis in cancer. (2010). *J Cell Mol Med*, **14**, 496-503.
- Watts, P. (2003). Retinoblastoma: clinical features and current concepts in management. *J Indian Med Assoc*, **101**, 464-6, 468.
- Wessels, G. & Hesselink, P.B. (1996). Unusual distribution of childhood cancer in Namibia. *Pediatr Hematol Oncol*, **13**, 9-20.

- Williams, K.J., Telfer, B.A., Xenaki, D., Sheridan, M.R., Desbaillets, I., Peters, H.J., Honess, D., Harris, A.L., Dachs, G.U., van der Kogel, A., Stratford, I.J. (2005). Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiother Oncol.*, **75**, 89-98.
- Wilson, M.W., Rodriguez-Galindo, C., Haik, B.G., Moshfeghi, D.M., Merchant, T.E. & Pratt, C.B. (2001). Multiagent chemotherapy as neoadjuvant treatment for multifocal intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology*, **108**, 2106-14; discussion 2114-5.
- Wilson, W.R. & Hay, M.P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **11**, 393-410.
- Winter, S.C., Shah, K.A., Han, C., Campo, L., Turley, H., Leek, R., Corbridge, R.J., Cox, G.J. & Harris, A.L. (2006). The relation between hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression with anemia and outcome in surgically treated head and neck cancer. *Cancer*, **107**, 757-66.
- Wolff JA, Boesel C, Ellsworth RM, Gallie B, Maurer H, Tretter P, et al. (1978). Extraocular retinoblastoma. In Children Cancer Study Group. Protocol CCSG. 962. New York.
- Wong, F.L., Boice, J.D., Jr., Abramson, D.H., Tarone, R.E., Kleinerman, R.A., Stovall, M., Goldman, M.B., Seddon, J.M., Tarbell, N., Fraumeni, J.F., Jr. & Li, F.P. (1997). Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk. *Jama*, **278**, 1262-7.
- Wouters, B.G. & Koritzinsky, M. (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer*, **8**, 851-64.

- Yang, M.H., Wu, M.Z., Chiou, S.H., Chen, P.M., Chang, S.Y., Liu, C.J., Teng, S.C. & Wu, K.J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol*, **10**, 295-305.
- Yeo, E.J., Chun, Y.S. & Park, J.W. (2004). New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol*, **68**, 1061-9.
- Yeole, B.B. & Advani, S. (2002). Retinoblastoma: An Epidemiological Appraisal with Reference to a Population in Mumbai, India. *Asian Pac J Cancer Prev*, **3**, 17-21.
- Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **5**, 237-41.
- Yotnda, P., Wu, D. & Swanson, A.M. (2010). Hypoxic tumors and their effect on immune cells and cancer therapy. *Methods Mol Biol*, **651**, 1-29.
- Zhang, H., Qian, D.Z., Tan, Y.S., Lee, K., Gao, P., Ren, Y.R., Rey, S., Hammers, H., Chang, D., Pili, R., Dang, C.V., Liu, J.O. & Semenza, G.L. (2008). Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 19579-86.
- Zhang, J., Cao, J., Weng, Q., Wu, R., Yan, Y., Jing, H., Zhu, H., He, Q. & Yang, B. (2010). Suppression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) by tirapazamine is dependent on eIF2alpha phosphorylation rather than the mTORC1/4E-BP1 pathway. *PLoS One*, **5**, e13910.
- Zhu, G.Q., Tang, Y.L., Li, L., Zheng, M., Jiang, J., Li, X.Y., Chen, S.X. & Liang, X.H. (2010). Hypoxia inducible factor 1alpha and hypoxia inducible factor

2alpha play distinct and functionally overlapping roles in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **16**, 4732-41.

Zimmerman, L.E. (1961). The Registry of Ophthalmic Pathology: past, present and future. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, **65**, 51-113.

Zinzalla, G. & Thurston, D.E. (2009). Targeting protein-protein interactions for therapeutic intervention: a challenge for the future. *Future Med Chem*, **1**, 65-93.



McGill

Miguel N. Burnier, Jr., MD, MsC, PhD, FRCSC
Professor of Ophthalmology, Pathology, Medicine, Anatomy & Cell Biology
General Director of Clinical Research & Training, MUHC-RI
Royal Victoria Hospital, 687 Pine Avenue West, Room H7-53, Montreal, Quebec H3A 1A1

Director
Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory
3775 University Street, Room 216, Montreal, Quebec H3A 2B4

Telephone: (514) 843-1544
Facsimile: (514) 843-1624
email: miguel.burnier@mcgill.ca

Telephone: (514) 398-7192 ext. 00490
Facsimile: (514) 398- 5728
email: miguel.burnier@mcgill.ca

Montreal, January 21st, 2011

To Whom It May Concern:

This is to inform you that the scientific project: **Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1-alfa and Retinoblastoma** from **Dr Maçanori Odashiro** was approved by the Ethics Committee at the Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory, McGill University, Montreal, QC, Canada.

If you have any questions, please, do not hesitate to contact me.

Best regards,



Miguel N. Burnier Jr. MD, PhD, FRCSC