**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

PAOLA CANDIDO RODRIGUES MENANI

**“Influência da hipóxia nas células tronco tumorais no
câncer de mama em modelo *in vivo* de indução de hipóxia”**

**Ribeirão Preto
2016**

Paola Candido Rodrigues Menani

**“Influência da hipóxia nas células tronco tumorais no câncer de
mama em modelo *in vivo* de indução de hipóxia”**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas.

Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Menani, Paola Candido Rodrigues

Influência da hipóxia nas células tronco tumorais no câncer de mama em modelo *in vivo* de indução de hipóxia

58 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi.

1. câncer de mama, 2. hipóxia,
3. célula tronco tumoral, 4. fatores de transcrição

Paola Candido Rodrigues Menani

Influência da hipóxia nas células tronco tumorais no câncer de mama em modelo *in vivo* de indução de hipóxia.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Tocoginecologia

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA:

À minha mãe, **Creusa**, por ser exemplo de determinação e honestidade e por sua incondicional dedicação aos seus filhos e netos. A quem sou grata por todas minhas conquistas.

Ao meu marido, **Ricardo**, por seu amor, paciência e apoio em todos os momentos.

Ao meu filho, **Pedro**, alegria da minha vida.

Ao meu pai, **Wilson** (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus irmãos Rodrigo e Marcela pelo carinho e apoio constante em todas as etapas da minha vida.

Ao Professor Daniel Guimarães Tiezzi por seu exemplo profissional, ensinamentos e dedicação.

Ao Professor Hélio Angoti Carrara, por sua disponibilidade, ensinamentos, dedicação e incentivo.

Aos colegas Renata Danielle Sichieri, Heriton Antonio, Willian Silveira e Wellington Martins, cujo conhecimento, apoio e parceria foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, onde estudei e tive a oportunidade de conviver com amigos, professores, funcionários e pacientes e que fará parte da minha vida para sempre.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade De Medicina De Ribeirão Preto USP, que me proporcionou todo aprendizado na residência médica e pela oportunidade em realizar minha pós-graduação.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, por toda a estrutura que proporciona aprendizado e tratamento adequado aos pacientes.

Aos pacientes, pelo aprendizado profissional e pessoal, que me fazem ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao professor Jurandyr Moreira de Andrade, por sua dedicação a este departamento, disponibilidade e profissionalismo.

Aos colegas de trabalho Viviane Fernandes Schiavon, Isabela Panzeri Carlotti Buzatto, Josie Bittencourt, Joaquim Moraes Sarmento, Larissa Raquel Mouro Mandarano, Franklin Pimentel, Willian Clagnan e Christiane Bisinoto pela troca de conhecimentos e pelo companheirismo.

À Suelen Bezerra, Ilza Mazzocato, Reinaldo Tavares, Ricardo Perussi, Rosane Casula, funcionários do departamento de ginecologia e obstetrícia, pela atenção com que sempre nos tratam e os auxílios que nos prestam.

À Cristiane Milanezi e ao Prof. João Santana, pela disponibilidade do laboratório.

Ao Prof. Carlos Gilberto Carlotti Junior por ceder o laboratório para a realização dos procedimentos de nosso trabalho.

“Viva como se fosse morrer amanhã, aprenda como se fosse viver a vida inteira”

(Mahatma Gandhi)

MENANI, P.C.R. “Influência da hipóxia nas células tronco tumorais no câncer de mama em modelo *in vivo* de indução de hipóxia”. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

RESUMO

Introdução: A hipóxia tumoral tem papel de fator prognóstico independente, estando relacionado a fenótipo mais agressivo, com maior capacidade de proliferação, invasão e disseminação metastática, além de maior resistência ao tratamento sistêmico e à radioterapia. As alterações do microambiente decorrente do baixo nível de oxigênio pode levar a formação de células tronco tumorais (CTTs) em células de câncer de mama, que são identificadas através da expressão de aldeído desidrogenase (ALDH1A1). Modelos experimentais para estudo da influência da hipóxia no desenvolvimento e progressão do câncer demonstram dados inconclusivos e controversos e estão limitados a modelos *in vitro* e modelos *in vivo* que submetem os camundongos a estado de hipóxia sistêmica. Em nosso estudo, desenvolvemos um modelo *in vivo* para estudar se o estado de hipóxia controlado, direcionado ao local do tumor, pode induzir a formação de CTT em câncer de mama de camundongos. **Métodos:** células da linhagem 67 NR foram introduzidas dentro do córtex renal de fêmeas de camundongos BALB/c. Foi colocado um clipe de aneurisma no hilo renal por 60 minutos para provocar hipóxia direcionada ao local do tumor. Os camundongos foram sacrificados após 24 horas ou 7 dias da hipóxia e foi realizada análise histológica para confirmar as mudanças induzidas pela isquemia na córtex renal e tumoral. Realizada dissecação tumoral microscópica e RT-PCR para análise da expressão CA9, HIF1A, HIF2A, Slug, SOX 9 e ALDH1 (TaqMan® Gene Expression Assay) no grupo controle e da hipóxia. TBP e HPRT foram os genes housekeeping e o crescimento *in vitro* de linhagem de células 67NR, usado como referência. **Resultados:** Todos os camundongos enxertados com células 67NR no córtex renal desenvolveram tumores locais. Foi observada necrose tubular aguda (NTA), decorrente da hipóxia tecidual direcionada. Os genes foram diferentemente expressos, comparando com as linhagens celulares. Notamos aumento significativo da ativação da via da hipóxia por aumento da expressão gênica de CA9, HIF1A e HIF2A. Ocorreu uma modulação para formação de CTTs. Observamos aumento de 2,9 e de 5,7 respectivamente, na expressão de SLUG, relação SLUG/SOX9 após 24 horas de hipóxia, redução de 2,7 vezes na expressão de SOX9 e não houve aumento na expressão de ALDH1. Entretanto, houve aumento de 2,1 vezes na expressão de ALDH1 7 dias após a hipóxia. **Conclusão:** Houve aumento da expressão de Slug e Slug/SOX9 precocemente ao aumento da expressão de ALDH1, em ambiente de hipóxia tumoral, o que sugere que há probabilidade de participação de Slug e SOX9 na formação de CTTs.

Palavras-chave: câncer de mama, hipóxia, célula tronco tumoral, fatores de transcrição

MENANI, P.C.R. **Influence of hypoxia on cancer stem cells in breast cancer in an *in vivo* model of hypoxia induction.** 58 p. Dissertation (Masters) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

ABSTRACT

The tumoral hypoxia is an independent prognostic factor in many solid malignant tumors. Low oxygen tension has been related to more aggressive phenotype, greater proliferation capacity, increased invasiveness and metastatic dissemination, and resistance to systemic treatment and radiotherapy. Changes in the microenvironment due low oxygen level lead to cancer stem cells formation (CSC) in breast cancer. The aldehyde dehydrogenase (ALDH1) cellular expression has been described as a CSC marker. Experimental models to study the influence of hypoxia on the development and progression of cancer have shown inconclusive and controversial data and are restricted to models *in vitro* and *in vivo* models in mice undergoing a state of systemic hypoxia. In our study, we developed an *in vivo* model to study whether the state of hypoxia controlled targeted to the tumor site may induce the formation of CSC in breast cancer in mice. Methods: 67 NR lineage cells were engrafted into the renal cortex of female BALB / c mice. Aneurysm clip was placed in the renal hilum for 60 minutes to induce hypoxia targeted to the tumor site. Mice were sacrificed after 24 hours or 7 days of hypoxia, and histological analysis was performed to confirm ischemia-induced renal cortex changes. Tumors were microdissected and RT-PCR was carried out to analyze the expression of CA9, HIF1A, HIF2A, Slug, Sox 9 and ALDH1 genes (TaqMan® Gene Expression Assay) in the control and hypoxia groups. TBP and HPRT were used as housekeeping genes and the cell lines 67NR growing in culture plate was used as reference. Results: All mice engrafted with cells in the renal cortex 67NR developed local tumors. Acute tubular necrosis (ATN) was observed, resulting from the targeted tissue hypoxia. The genes were expressed differently, compared with cell lines. We notice a significant increase in activation of the hypoxia by increased gene expression of CA9, HIF1A and HIF2A, 24 hours after renal tumor ischemia. There was increased by 2.9 and 5.7 fold, respectively, in the expression of SLUG and SLUG/SOX9, no difference in ALDH1 and reduced by 2.7 fold in the expression of SOX 9, 24 hours after ischemia. There was increased by 2.1 fold in ALDH1 expression 7 days after ischemia. Conclusion: There was increased in expression of SLUG and SLUG/SOX9 early expression of ALDH1 in tumor hypoxia environment. This suggests are likely SLUG and SOX9 have role in cancer stem cell transformation.

Keywords- breast cancer, hypoxia, tumor stem cells, transcription factors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Influencia do microambiente das CTT no processo biológico da tumorigenese	18
Figura 2. Modelo que mostra o efeito do gradiente de oxigênio tumoral na agressividade tumoral	23
Figura 3. Resposta ao estado hipóxia - Estímulo de HIF na angiogêneses e carcinogênese	24
Figura 4. Ação de Slug e SOX9 não linhagens celulares epiteliais mamárias	27
Figura 5. Exposição do hilo renal após abertura da cavidade abdominal e afastamento do intestino	32
Figura 6. Colocação do <i>clamp</i> de aneurisma cerebral abrangendo todo o hilo e evidente isquemia renal	33
Figura 7. Retirada do <i>clamp</i> do hilo renal, após 60 minutos e, retorno da circulação renal	33
Figura 8. Plano do estudo. Analisados 4 grupos de 6 camundongos. Separados grupos submetidos a hipóxia e sacrificados após 24 horas e 7 dias da isquemia e seus controles	34
Figura 9. NTA em córtex renal de camundongo submetido ao aloenxerto de linhagem 67 NR, após 7 dias da hipóxia	41
Figura 10. Linhagem 67NR de aloenxerto dentro do córtex renal após 7 dias no grupo controle	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sondas de cDNA dos genes estudados (Ca9, ALDH1, Slug e Sox9) e dos genes house-keeping (Tbp e Hprt)	38
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Grafico 1. Quantificação Absoluta- RT-PCR	39
Grafico 2. Quantificação Relativa- RT-PCR	39
Grafico 3. Expressão gênica de CA9, HI1a e HIF2a tumoral no grupo de camundongos sacrificados após 24 horas de hipóxia	42
Gráfico 4. Expressão gênica de Slug e SOX9 tumoral e relação da expressão Slug/SOX9 no grupo de camundongos sacrificados após 24 horas de hipóxia ...	43
Grafico 5. Expressão gênica de ALDH1 nos grupos sacrificados após 24 horas e após 7 dias da hipóxia. Relação Slug/Sox9 nos grupos sacrificados após 24 horas da hipóxia.	44
Grafico 6. Expressão gênica relativa de Ca9, HIF 1a, HIF 2a, Slug, SOX 9, ALDH1 e relação Slug/SOX9 após hipóxia. Análise dos grupos submetidos a isquemia e sacrificados após 24h e após 7 dias	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH1-	Aldeidodehidrogenase 1
Ang-2 -	Angioproteína 2
BALB/cfC3 -	Sub-espécie de Camundongo Albino Criado em Laboratório
bFGF-	Fator de Crescimento de fibroblasto
CA 9-	Anidrase Carbônica 9
cDNA-	molécula de DNA complementar
CD24-	Antígeno Estável ao Calor (gene CD24)
CD44-	Glicoproteína de Superfície Celular (gene CD44)
CDH1-	gene da E-caderina
CITs-	Células Iniciadoras de Tumor
COX-2-	Ciclooxygenase 2
CT-	Tresholdcycle
CTT-	Célula tronco tumoral
DNA-	acido desoxirribonucleico
ESA-	Antígeno epitelial específico
HIF1a-	Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia 1 alfa
HIF2a-	Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia 2 alfa
Hprt-	gene housekeeping
MaSC-	Célula tronco mamária
MCF-7-	Linhagem Celular de Câncer de Mama Humano

MDA-MB-231-	Linhagem Celular de Câncer de Mama Humano
NTA-	Necrose Tubular Aguda
O2-	Oxigênio
PBS-	Fosfate buffered saline
PCR-	Reação em cadeia da polimerase
PDGF-	Fator de Crescimento derivado de plaqueta
RNA-	acido ribonucéico
RQ PCR-	pcr quantitativo em tempo real
SLUG-	Repressor Transcricional Contendo Zinco
Snail-	Familia de genes da qual pertence o Slug
SOX9-	Fator de Transcrição determinante da região Y
Tbp-	gene housekeeping
TP-	timidina fosforilase
U-104-	Inibidor específico de Ca9
VEGF-	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
4T1-	Linhagem de câncer de mama murino metastática
67NR-	Linhagem de câncer de mama murino não metastática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Câncer de mama, hipóxia e o estado de Célula tronco tumoral	17
1.2 Linhagens celulares e modelo de hipóxia tumoral.....	28
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Desenho do estudo e aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo COBEA.....	31
3.2 Modelo murino de alotransplante de células do câncer de mama.....	31
3.3 Modelo experimental de isquemia tumoral	32
3.4 Desenho do estudo	34
3.5 Análise histológica.....	35
3.5.1 Avaliação do efeito da hipóxia no parênquima renal - NTA.....	35
3.6 Obtenção de material para análise experimental	35
3.6.1 Extração de RNA tecidual	36
3.6.2 Quantificação das amostras de RNA total.....	36
3.7 Expressão dos gene analisados.....	37
3.7.1 Obtenção do cDNA	37
3.7.2 Análise da expressão genética pela técnica de PCR quantitativo em tempo real	37
3.8 Análise estatística	39
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Indução de hipóxia tumoral por isquemia renal - Necrose tubular aguda renal...	41

4.2 Indução de hipóxia tumoral por isquemia renal- análise de marcadores de hipóxia tumoral	42
4.3 Expressão de Slug e Sox 9 e relação Slug/Sox9	43
4.4 Expressão de ALDH1- marcador de células tronco tumorais (CTTs).....	44
4.5 Análise geral da expressão gênica do estudo	45
 5 DISCUSSÃO	46
 6 CONCLUSÕES	50
 7 REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama, hipóxia e o estado de Célula tronco tumoral

O câncer de mama é uma doença muito prevalente, sendo a doença maligna mais frequente em mulheres em todo o mundo, excluindo-se câncer de pele não melanoma. No Brasil, estima-se 57960 casos novos em 2016. Em 2014, a sobrevida média após 5 anos na população geral era de 61%. A maior mortalidade evidenciada no Brasil deve-se ao diagnóstico da doença em estádios mais avançados. Em países desenvolvidos a sobrevida se aproxima de 85% e em subdesenvolvidos, de 59 a 60 % (INCA, 2015).

A detecção precoce e a introdução de novas modalidades de tratamento fizeram reduzir as taxas de mortalidade do câncer de mama, porém, as taxas de incidência e recorrência ainda permanecem altas e o tratamento normalmente segue um padrão único para grandes grupos de pacientes (JEMAL et al., 2009; EVANS et al., 2012). Isso acontece porque os mecanismos biológicos que estão envolvidos na iniciação e progressão tumoral ainda são pouco conhecidos (RAZZAK; LIN; WINER, 2008).

Por ser uma doença heterogênea, pacientes com fatores prognósticos e estágio clínico semelhante podem ter prognósticos diferentes. O tratamento individualizado das pacientes é cada vez mais preconizado para que se possa alcançar maior sucesso. Na era da genômica e da medicina personalizada, a quimioterapia passou a utilizar medicamentos específicos, como antagonistas hormonais, anticorpos monoclonais e modalidades da terapia alvo-dirigida. No entanto, devido à grande variedade biomolecular e comportamento neoplásico distinto, ainda temos muita limitação para empregarmos o tratamento adequado e garantirmos maior sobrevida global ou maior sobrevida livre de doença para as pacientes com câncer de mama (RAZZAK; LIN; WINER, 2008).

O câncer de mama é subdividido em 4 subtipos: luminal A, luminal B, Her- 2 positivo e triplo negativo. No entanto, cada subtipo pode possuir expressões gênicas diferentes dentro do próprio grupo, sendo importante a determinação de genes envolvidos com a propagação tumoral (POMP et al., 2014).

Estudos recentes mostram que os tumores sólidos apresentam uma composição celular bem diversificada e que apenas uma pequena parcela dessas células apresenta capacidade de se proliferar e gerar novos tumores. Esta capacidade tem sido elucidada pelos modelos estocástico, hierárquico e o que defende a plasticidade celular.

No modelo estocástico, durante a expansão clonal ocorre uma seleção de clones mais resistentes ao ambiente hostil no qual a neoplasia está se desenvolvendo. Desta forma, hipóxia, resposta imune e angiogênese, entre outros fatores hostis, colaboram para gerar, aleatoriamente, células com diferentes fenótipos. No modelo hierárquico, temos a idéia de uma célula tronco tumoral com capacidade de auto-renovação e diferenciação. As células progenitoras, filhas de células tronco tumorais, sofrem diferenciação formando populações fenotipicamente distintas. Existe ainda uma terceira explicação que é a plasticidade celular. Durante a expansão clonal, células malignas têm a capacidade de se diferenciar ou indiferenciar. Essa modificação fenotípica é influenciada por seu componente epitelial, mas também sofre importante influência das condições do microambiente tumoral, como tensão de oxigênio e resposta imune (REYA et al., 2001; MORRISON et al., 2008; KENNY; LEE; BISSELL, 2007; MANI et al., 2008; BOMKEN et al., 2010; CORREIA; BISSELL, 2012).

Muitos estudos identificaram a presença de células iniciadoras de tumor (CITs) com alta capacidade de proliferação, disseminação e plasticidade, chamadas células tronco tumorais (CTTs) em tumores sólidos como o câncer de mama (AL-HAJJ et al., 2003) (Figura 1).

Figura 1. Influência do microambiente das CTT no processo biológico da tumorigenese - Adaptado de TOMAO F et al. *J Cancer*. 2014; 5(5):301-310.

Tumores sólidos geralmente têm grande heterogeneidade celular, mesmo que tenha a mesma célula de origem (MARUSYK et al., 2012). As células diferenciadas constituem o volume tumoral, porém, segundo a teoria das células tronco, elas não são tumorigênicas devido à perda da capacidade de auto-renovação e por apresentar um limitado potencial de proliferação (BONNET; DICK, 1997).

Evidências experimentais sobre a teoria das células tronco tumorais foram inicialmente descritas em 1997, com a demonstração de que uma pequena população de células tronco leucêmicas era capaz de transferir a doença para modelos xenográficos (BONNET; DICK, 1997). Este conceito foi estendido para tumores sólidos e uma subpopulação celular com características de células primordiais foi identificada em tumores mamários, utilizando-se marcadores de superfície celular (AL-HAJJ et al., 2003).

As CTTs são definidas como linhagens celulares dentro do tumor, que possuem capacidade de auto-renovação e definem um contínuo crescimento tumoral (CLARKE et al., 2006; KASAI et al., 2014).

Sabe-se que as CTT têm capacidade de formar colônias de esferas *in vitro* (DONTU et al., 2003). Além disso, estudos mostraram que este subconjunto celular confere resistência à quimioterapia e à radioterapia (PHILLIPS; MCBRIDE; PAJONK, 2006; GONG et al., 2010). Portanto, a presença de CTTs pode determinar pior prognóstico, recorrência e resistência ao tratamento no câncer de mama (GONG et al., 2010).

A identificação e análise das CTTs dentro do tumor são limitadas, conhecendo-se alguns marcadores celulares relacionados, como a atividade da aldeído desidrogenase-1 (ALDH1) e CD44⁺/CD24⁻ (AL HAJJ et al., 2003; CARIATI et al., 2008; GINESTIER et al., 2007; WRIGHT et al., 2008).

No câncer de mama, as CTTs podem ser identificadas pela expressão de proteínas de membrana celular. A utilização de citometria de fluxo para fenotipagem e caracterização desta população tem sido descrita por alguns autores. Foi demonstrado que as células ESA⁺/CD44⁺/CD24⁻ têm uma alta capacidade de iniciação e auto-renovação tumoral no carcinoma de mama (AL HAJJ et al., 2003).

A presença de CTTs nos carcinomas invasivos é muito variável. Na linhagem celular MCF-7, a ocorrência de células CD44⁺/CD24⁻ não chega a 1%. Já na linhagem metastática MDA-MB-231, essa taxa chega até 90%. Abraham BK et al. (2005)

analisaram a prevalência de células CD44⁺/CD24⁻ no câncer de mama utilizando imunohistoquímica com dupla marcação e observaram uma variação de 0% a 80%.

Nosso grupo observou uma variação de 0% a 52% de células CD44⁺/CD24⁻ em amostras a fresco de carcinomas ductais invasivos da mama em estágio inicial (I e II). Adicionalmente, neste estudo prospectivo com 40 pacientes portadoras de câncer de mama em estágio I e II, foi analisada por citometria de fluxo a quantidade de células CD44⁺/CD24⁻ na população de células ESA⁺ em amostras de tumores à fresco. Evidenciou-se que existe uma associação entre o aumento desta subpopulação celular no tumor primário e a presença de metástases para linfonodos regionais, demonstrando que a população de células CD44⁺/CD24⁻ possa ter papel importante na disseminação tumoral (VALEJO et al., 2010).

Estudos mais recentes têm demonstrado que as CTTs podem ser identificadas através de outros métodos. O grupo de pesquisa liderado por Max Wicha demonstrou que a expressão de aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) é melhor marcador de CTT no câncer de mama que a imunofenotipagem (CHARAFE-JAUFFRET et al., 2009; GINESTIER et al., 2007). Wicha et al, 2007, identificaram a presença de expressão de ALDH em CTTs, através de ensaios evidenciando células aldefluor positivas. Posteriormente, foi identificada expressão de CD44, CD24 e ALDH em grande variedade de carcinomas, como pâncreas, cólon, pulmão, ovário e próstata (ERAMO et al., 2008; HUANG et al., 2009; KRYZEK et al., 2012; LI et al., 2007; PRINCE et al., 2007).

A alta expressão da ALDH em câncer de mama tem sido evidenciada como um importante fator associado a mau prognóstico, apresentando correlação direta ou inversa com conhecidos fatores clínico-patológicos, como aparecimento precoce de metástases e resistência aos agentes quimioterápicos (GINESTIER et al., 2007; TANEI et al., 2009; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2010; GONG et al., 2010).

Além disso, trabalhos experimentais utilizando modelos xenográficos mostram que após inoculação, as células ALDH positivas são capazes de formar tumores em modelos xenográficos, o que não é observado nas células ALDH negativas (CHARAFE-JAUFFRET et al., 2010).

Estudos que avaliaram a expressão gênica em tecido mamário normal e tecido com neoplasia maligna mostraram que a isoforma ALDH1A1 é a mais comumente responsável pela atividade da ALDH observada nas populações de células tronco tumorais (HESS et al., 2004).

A ALDH1 é uma enzima responsável pela oxidação de aldeídos intracelulares e confere resistência a agentes alquilantes e proteção celular contra o stress oxidativo, proporcionando maior longevidade à CTT (PHILIPS et al., 2006; GONG et al., 2010; HUANG et al., 2009). Além disso, a ALDH1 pode ter um papel na diferenciação precoce e proliferação das CTTs, devido a seu papel na oxidação do ácido retinóico, um modulador da proliferação celular (HUANG et al., 2009). Consequentemente, a atividade de ALDH1 pode servir como um relevante marcador prognóstico (GINESTIER et al., 2007; WRIGHT et al., 2008; TANEI et al., 2009; RESETKOVA et al., 2010).

A expressão de ALDH1 está associada a características tumorais desfavoráveis no câncer de mama, como alto grau, ausência de expressão de receptor hormonal, status her-2 positivo e subtipo basal-like (GINESTIER et al., 2007; FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010; NALWOGA et al., 2010; ZHOU et al., 2010).

O grupo de Wicha, em 2012, realizou um estudo com modelos xenográficos de câncer de mama e observou que a utilização de drogas antiangiogênicas leva a um aumento na proporção de células ALDH positivas no tumor após o tratamento. Corroborando estes achados, uma série de estudos tem demonstrado que a população de CTTs aumenta em linhagens celulares mantidas em ambiente com baixa tensão de oxigênio. Essas observações suportam a hipótese de que a hipóxia tecidual pode ser responsável pela modulação da expressão de genes responsáveis pela determinação de um fenótipo mais agressivo e menos diferenciado que predispõe a invasão e a disseminação tumoral, as CTTs (DAS et al., 2008).

No ambiente onde ocorre a tumorigênese, a hipóxia pode estar presente devido a diversos fatores como proliferação celular, fibrose, dano celular e drogas. A hipóxia é um importante estressor celular e funciona como gatilho para estimular programas de sobrevivência celular, fazendo-as adaptarem-se ao novo ambiente. A hipóxia funciona como fator prognóstico independente, correlacionado a estádios avançados da neoplasia, a maior resistência à terapia convencional e à redução da sobrevida livre de doença, com maior recorrência tumoral (BRIZEL et al., 1996; HOCKEL et al., 1996; YOUNG et al., 1988).

Tumores sólidos contêm regiões com oferta insuficiente de oxigênio e suas células podem assumir fenótipo semelhante às células tronco. A hipóxia foi correlacionada com progressão tumoral no início do século XX, quando pesquisadores observaram maior taxa de glicólise na presença de alta tensão de

oxigênio e ligação direta de hipóxia e radiorresistência (CARMELIET; JAIN, 2000; POUYSSEGUR; DAYAN; MAZURE, 2006). Tumores submetidos a hipóxia parecem ser mais agressivos, com redução da apoptose e aumento de resistência a drogas (GRAEBER et al., 1996; ROFSTAD, 2000; SUBARSKY; HILL, 2003).

A hipóxia pode provocar instabilidade genômica pela regulação negativa de genes de reparo do DNA (MIHAYALOVA et al., 2003; BINDRA et al., 2005).

Pode-se identificar a presença de hipóxia indiretamente por imunohistoquímica ou por moléculas endógenas indutoras de hipóxia, como fatores indutores de hipóxia (HIFs), anidrase carbônica 9 (CA9). Estes fatores agem como reguladores da homeostase do oxigênio nas células (EVANS; KOCH, 2003; MOON et al., 2007).

Muitas das adaptações à hipóxia são mediadas pela ativação de genes específicos, através de fatores indutores de hipóxia (HIFs). HIFs, fatores de transcrição associados com a resposta celular à hipóxia, regulam o aumento da expressão de vários genes em resposta a hipóxia, como enzimas glicolíticas, fator de crescimento endotelial e matriz metaloproteinase (PAWLUS et al., 2012).

Juntos, esses fatores modulam o metabolismo celular do câncer e podem promover angiogênese, invasão e metástase, levando a pior sobrevida, o que sugere que as proteínas derivadas dos HIFs podem representar alvos para terapias para o câncer (KAYA et al., 2012; HARTWICH et al., 2013).

Há 3 genes dos fatores indutores de hipóxia (HIFs) conhecidos, mas os genes HIF1A e HIF2A são mais estudados. Sua expressão se relaciona com a adaptação do organismo à hipóxia e com o estímulo à entrega de oxigênio (SEMENZA; WANG, 1992).

HIF-1 estimula processos como angiogênese, glicólise e eritropoiese, por meio de ativação de genes responsáveis por esses mecanismos (JIANG et al., 1996). Desse modo HIF-1 permite que a célula se adapte, aumentando o aporte de oxigênio e estimulando a sobrevida celular, dependendo da oferta de oxigênio local (RATCLIFFE et al., 1998; COWDER et al., 2014) (Figura2).

Figura 2. Modelo que mostra o efeito do gradiente de oxigênio tumoral na agressividade tumoral. Adaptado de CROWDER et al.(2014).

Estudos evidenciam elevação da expressão de HIF1A na carcinogênese mamária (BOS et al., 2001). A hipóxia, através de HIF1A, induz a secreção de fatores pro-angiogênicos, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angioproteína 2 (Ang-2), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de crescimento de fibroblasto (HANAHAN D; FOLKMAN J,1996; SHWEIKI D et al.,1992; RUAN K; SONG G; OUYANG G, 2009).

A ação de HIF-1 na redução da atividade de inibidores da angiogênese colabora com processo pró-angiogênico que culmina com pior prognóstico em pacientes com câncer no sistema nervoso central, de pulmão não células pequenas, de mama, de ovário, de útero e de colo de útero. (MABJEESH NJ; AMIR S, 2007).

Além do papel na angiogênese tumoral, HIF se correlaciona com mutações em genes supressores tumorais, que causa aumento da proliferação celular, redução da apoptose e desenvolvimento de resistência a quimioterápicos. HIF1A e HIF2A são altamente expressos em câncer e podem ser fator prognóstico para alguns tipos (YOSHIMURA et al.,2004) (Figura 3).

Figura 3. Resposta ao estado hipóxia - Estímulo de HIF na angiogênese e carcinogênese. As células coradas em azul são as em estado de hipóxia e as rosas são bem oxigenadas. HIF-fatores de indução de hipóxia, VEGF-fator de crescimento endotelial, bFGF- fator de crescimento de fibroblasto, TP-timidina fosforilase, COX-2- ciclooxigenase-2. Extraído de YOSHIMURA et al.,2004.

Câncer de mama com alta expressão de HIF2A tendem a ter metástases a distância e foi associado com menor sobrevida das pacientes. Análises univariadas e multivariadas indicaram que a expressão de HIF2A foi fator prognóstico independente para a progressão do câncer de mama (WANG et al., 2014).

Estudos demonstraram que a expressão de HIF2A é elevada em vários tipos de tumores sólidos, incluindo colorretal, gástrico, oral de células escamosas, pulmão não-células pequenas. Por esta super-expressão, acredita-se que HIF2A possa ser um oncogene. Culturas celulares e experimentos animais apoiam esta especulação, mostrando que a redução da expressão do gene HIF2A pode suprimir a proliferação celular e lentificar o crescimento tumoral (WANG et al., 2010; ZHU et al., 2010; XUE et al., 2012).

Outro regulador da homeostase de O_2 nas células, a proteína induzida por hipóxia, anidrase carbônica 9 (Ca9), regula o pH tumoral e a sobrevida celular, por meio do aumento do transporte de ácidos que acumulam dentro do tumor, devido a grande distância entre as células e os capilares (SWIETACH et al., 2010).

Lock et al.(2013) evidenciaram que a inibição da expressão do gene Ca9 ou de sua atividade funcional inibiu a expansão das CTT submetidas a hipóxia.

Crowder et al. (2014) observaram que a redução da expressão de Ca9 está relacionada com a redução do número de CTTs *in vitro*. Além disso, tratamento com inibidor específico de Ca9, U-104, foi responsável por reduzir o volume tumoral em camundongos e por eliminar a capacidade metastática de tumores primários de pulmão, podendo servir como um provável alvo para terapia em câncer de mama.

Uma série de estudos tem demonstrado que a população de CTTs aumenta em linhagens celulares mantidas em ambiente com baixa tensão de oxigênio e que a hipóxia pode inibir a diferenciação celular e promover a manutenção de CTT. Portanto, o ambiente de hipóxia pode levar a uma maior agressividade tumoral (DAS et al., 2008).

Em 2012, o grupo de Wicha relacionou o aumento de células ALDH positivas em ambiente submetido a ação de drogas antiangiogênicas com aumento de CTT, por terem maior capacidade de desenvolverem tumores (CONLEY et al., 2012).

Outros estudos demonstraram que as células ALDH positivas se localizam, mais frequentemente, na porção central dos tumores, onde ocorre mais frequentemente a hipóxia, por ser o local de mais difícil aporte de oxigênio. Isto nos faz relacionar o ambiente de hipóxia com maior concentração de CTTs (LIU et al., 2014).

No entanto, achados controversos de diferentes estudos, provavelmente, são decorrentes de modelos *in vitro* ou *in vivo* que utilizaram drogas indutoras de hipóxia ou que submetem todo o organismo a baixa tensão de oxigênio, que, hipoteticamente, criam um estado de hipóxia sistêmica. O qual, não reproduz verdadeiramente o significado clínico da hipóxia tumoral local. Desta maneira, se utilizado um modelo que consiga estabelecer um estado de hipóxia específico para o sítio tumoral, pode-se conseguir dados mais fidedignos do efeito da hipóxia sobre as alterações encontradas na modulação gênica. Um modelo xenográfico *in vivo* foi desenvolvido por Antonio et al. (2013). Neste modelo, ao ser inserido clamp de aneurisma no hilo renal de camundongos, pretende-se direcionar o estado de hipóxia especificamente ao sítio do tumor primário, podendo representar de maneira mais fidedigna o efeito direto da baixa tensão de oxigênio na modulação gênica e evidenciar sua relação com o aumento de CTTs locais.

Os fatores que regulam a transformação e manutenção da célula em estado de célula tronco adulta são pouco compreendidos. Alguns estudos demonstraram que fatores de transcrição celular têm papel fundamental na determinação deste estado e

a determinação destes fatores é importante para que possa nos dar alternativas para conter a capacidade de agressividade tumoral (TAPSCOTT et al., 1988; HALDER et al., 1995).

Guo et al. (2012) estudaram a relação de fatores de transcrição celular com a determinação do estado de célula tronco tumoral. Foram identificados 2 fatores de transcrição, fortemente relacionados com o estado de célula tronco tumoral, conferindo a estas células maior estado proliferativo e poder de disseminação. Slug e SOX9 apresentaram correlação com a mudança de estado das células bem diferenciadas para células com fenótipo de células tronco. Slug promove o fenótipo basal quando expresso ectopicamente em células progenitoras luminais. SOX9 promove atividade progenitora luminal em células luminais diferenciadas e atividade de célula tronco em células basais diferenciadas.

Guo et al. (2012) ainda evidenciaram que a co-expressão de Slug e SOX9 converte células mamárias luminais para células iniciadoras de tumor, as CTTs. No entanto, Slug e SOX9 induzem CTT por ativarem distintos programas de expressão gênica. A co-expressão destes fatores de transcrição também promove habilidades tumorigênicas e metastáticas, levando à menor sobrevida e sugere que a relação Slug/SOX9 elevada pode associar-se com pior prognóstico tumoral (Figura 4).

Outro estudo evidenciou aumento da expressão de SOX9, concomitante ao aumento da expressão de Slug nas células, o que promoveu a superexpressão de seus genes alvo e provável aumento da capacidade metastática tumoral. Isto poderia ser uma importante explicação para a ligação das CTTs com a manutenção de fatores que favorecem o estado de CTTs (FASILTY et al., 2015).

Figura 4. Ação de Slug e SOX9 em linhagens celulares epiteliais mamárias. A linha pontilhada indica conversão de células diferenciadas para células tronco ou células progenitoras. *A transformação de células mioepiteliais diferenciadas ou de células mioepiteliais progenitoras em célula tronco por ação de SOX 9 ainda não está determinada. Extraído de GUO et al., 2012.

Slug pertence à família Snail. O gene Snail 2, localizado no cromossomo 8q11, codifica a proteína Slug, que é um inibidor do gene promotor da E-caderina (CDH1). Portanto, pode inibir as ligações intercelulares e aderência celular, favorecendo a invasão tumoral e metástases (PARK et al., 2008). Estudos evidenciaram que a expressão de Slug no câncer de mama está relacionado a pior prognóstico, envolvimento de linfonodos e metástases a distância (STORCI et al., 2008) Foi evidenciado que a expressão de Slug está fortemente associada à invasão e metástases em carcinoma lobular (DA SILVA et al., 2008). Outros estudos in vitro e in vivo que evidenciam aumento da expressão de Slug e redução da expressão de e-caderina podem promover progressão tumoral em câncer de mama não basal-like (PRASAD et al., 2009; CÔME et al., 2006)

Sox 9, gene localizado no cromossomo Y, corresponde a fator de transcrição, que junto com Slug induzem a formação de organoides sólidos por células luminais diferenciadas, podendo estar associado a formação de CTTs (GUO et al., 2012).

Em seu trabalho Guo et al. (2012), observou que com o aumento da expressão de Slug pode haver aumento do número de organóides formados a partir de células

progenitoras, mas não há formação de organóides a partir de células diferenciadas. Por outro lado, a expressão isolada de SOX9 em células luminais, parece induzir a formação de estruturas acinares quando o Slug está suprimido, mas não forma organóides.

Este mesmo estudo evidenciou redução de 5 vezes de metástases pulmonares quando suprimido gene Slug e de 40 vezes, quando suprimido gene Sox 9, em modelos experimentais com células MDA-MB 231. Isto sugere que esses fatores de transcrição são importantes no controle da doença sistêmica. Ainda, a grande proliferação celular associada às células que continham expressão de Slug em comparação as células que não expressavam este gene (1/250 x 1/6000, respectivamente), mostrou que este gene confere maior potencial de agressividade associado à tumorigênese (GUO et al., 2012).

Desta forma, a formação de CTTs a partir de células diferenciadas parece dever-se a co-expressão de Slug e SOX9, estando ambos os genes associados a pior prognóstico tumoral (GUO et al., 2012).

1.2 Linhagens celulares e modelo de hipóxia tumoral

Várias linhagens tumorais com um espectro fenotípico de metástases foram isolados de tumores mamários em camundongos BALB/cfC3H, para determinar o papel da transição epitélio-mesênquima em prever a propensão para metástases espontâneas. Estudos foram realizados com estas linhagens celulares e foram extensivamente caracterizadas como tumorigênicas e metastáticas, *in vivo* (ASLAKSON; MILLER, 1992). A linhagem celular 4T1, por exemplo, é altamente tumorigênica e sabidamente metastática para múltiplos sítios como pulmão, ossos, linfonodos, fígado, cérebro e abdome. Já, a linhagem 67NR não possui propriedade metastática, mas forma tumor primário na glândula mamária (LOU et al., 2008). Quando injetadas dentro da glândula mamária do camundongo, estas linhagens tumorais são, de modo idêntico, não metastáticas ou produzem espontaneamente metástases para vários sítios com menor frequência (ASLAKSON; MILLER, 1992).

Dessa forma, várias linhagens celulares com diferentes propriedades metastáticas têm sido objeto de estudo das possíveis alterações e interações

moleculares decorrentes do processo de modulação gênica que leva ao estado de CTT. Entretanto, notou-se pouca correlação entre as diferentes expressões gênicas e moleculares e a habilidade de metástases, havendo uma grande variação na expressão de marcadores, bem como na migração e capacidade de invasão entre linhagens celulares de diferentes agressividades e propensão metastática (LOU et al., 2008).

2 OBJETIVOS

- 1 - Definir a aplicação experimental de um modelo *in vivo* de hipóxia tumoral localizada;
- 2 - Analisar a influência da hipóxia na formação de células tronco tumorais (CTTs), por meio da análise da expressão gênica de ALDH1;
- 3 - Analisar a expressão gênica dos fatores de transcrição Slug e Sox9 no processo de formação de células tronco tumorais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo e aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo COBEA

Trata-se de um trabalho prospectivo que utilizou um modelo murino de alotransplante de células de câncer de mama e um modelo experimental de isquemia tumoral (ANTONIO, 2013).

O protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 099/2012, sobre o projeto “**Modelo *in vivo* de indução de hipóxia tumoral para o estudo da progressão e metástase do câncer de mama**”, sob responsabilidade do Professor Doutor Daniel Guimarães Tiezzi foi considerado **DE ACORDO** com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo **APROVADO** em reunião do dia 30 de julho de 2012.

3.2 Modelo murino de alotransplante de células do câncer de mama

Utilizamos a linhagem celular de câncer de mama murino 67 NR (não metastática). As células foram mantidas em cultura com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37° C. Inoculamos 10⁵ células no parênquima do rim esquerdo de cada camundongo. Utilizamos a linhagem BALBc para o modelo experimental. O procedimento de inoculação foi realizado por visão direta do rim utilizando um procedimento cirúrgico. Os animais foram submetidos à anestesia com injeção intraperitoneal com a combinação de ketamina 60 mg/Kg e xilazina 8 mg/Kg. Após a tricotomia da região dorsal, realizamos uma incisão longitudinal para-vertebral esquerda com abertura da cavidade abdominal por planos e exposição da loja renal esquerda. Sob visão direta, procedemos a injeção da solução de células no parênquima renal. A parede abdominal e a pele foram suturadas com fio de poliglactina 910 5-0 em pontos separados.

3.3 Modelo experimental de isquemia tumoral

Após 7 dias do alotransplante de células 67 NR no parênquima renal, realizamos o procedimento de isquemia renal, para ocasionar hipóxia direcionada ao tumor.

A isquemia renal foi realizada por meio de ligadura do hilo renal sob visão direta.

Os animais foram anestesiados novamente seguindo o mesmo protocolo anterior. Após a tricotomia da parede abdominal, realizamos uma incisão longitudinal para-mediana com abertura da cavidade abdominal por planos. Com auxílio de uma pinça anatômica afastamos o intestino para expor o hilo renal (Figura 5). Após, colocamos um clamp de aneurisma cerebral abrangendo todo o hilo (Figura 6). Suturamos a parede abdominal com algodão 3-0 em pontos contínuos e, após 60 minutos, a sutura foi retirada para a remoção do clamp. Removido o clamp, a parede abdominal foi novamente suturada com poliglactina 910 5-0 em pontos separados (Figura 7). Este procedimento foi realizado para analisar o efeito da isquemia transitória no fenótipo e biologia tumoral.

Figura 5. Exposição do hilo renal após abertura da cavidade abdominal e afastamento do intestino

Figura 6. Colocação do *clamp* de aneurisma cerebral abrangendo todo o hilo e evidente isquemia renal.

Figura 7. Retirada do *clamp* do hilo renal, após 60 minutos e retorno da circulação renal.

3.4 Desenho do estudo

Foram selecionados 4 grupos de 6 camundongos, no total de 24 camundongos. Os grupos foram divididos em camundongos sacrificados após 24 horas da isquemia e grupo controle; camundongos sacrificados após 7 dias da isquemia e grupo controle. Os camundongos foram sacrificados 24 horas ou 7 dias após a isquemia renal.

Figura 8. Plano do estudo. Analisados 4 grupos de 6 camundongos. Separados grupos submetidos a hipóxia e sacrificados após 24 horas e 7 dias da isquemia e seus controles.

Após o sacrifício dos animais foi realizada a exérese do rim esquerdo para análise do efeito da hipóxia local.

Nos grupos sacrificados após 24 horas da isquemia renal foram realizadas análises da expressão genética de marcadores de hipóxia tumoral (Ca9), de fatores de transcrição (Slug e SOX 9 e a relação Sulg/SOX9) e de marcador de célula tronco tumoral (ALDH1).

Nos grupos sacrificados após 7 dias da isquemia renal foram realizados análise da expressão de marcador de célula tronco tumoral (ALDH1) e análise histológica do parênquima renal para evidência do efeito da hipóxia local.

A expressão gênica na linhagem celular 67 NR *in vitro* foi referência para os valores de expressão gênica encontrados no grupo controle e no grupo submetido a isquemia, sacrificados após 24 horas e 7 dias da hipóxia.

3.5 Análise histológica

3.5.1 Avaliação do efeito da hipóxia no parênquima renal - NTA

Analizamos a histologia renal dos camundongos que foram submetidos a isquemia renal intermitente por 1 hora após o alotransplante de células 67NR para avaliar possíveis alterações decorrentes da hipóxia.

Para isto, observamos a presença de necrose tubular aguda (NTA) renal nos grupos de camundongos sacrificados após 7 dias da isquemia renal e seu grupo controle.

Foram realizadas amostras para fixação em formol e processamento em parafina, para conseqüente cortes histológicos e realização de imunohistoquímica. Foram montados em lâminas de vidro e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

3.6 Obtenção de material para análise experimental

Os camundongos sacrificados após 24 horas e 7 dias da isquemia renal e seus controles foram submetidos a extração renal e microdissecção dos tumores renais que se formaram pelo alotransplante de células 67 NR. Foi realizada microdisseção através de microcirurgia, utilizando-se microscópio (400x) e, coletada amostra tumoral para análise genética.

3.6.1 Extração de RNA tecidual

A extração de RNA total foi realizado com TRIzol® (Invitrogen, EUA), segundo o protocolo do fabricante. Às amostras, foram adicionados 250µl de PBS (phosphate-buffered saline) e 750µl de TRIzol® (Invitrogen, EUA). O fragmento de tecido foi homogeneizado com a utilização de um aparelho Politron®. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foi acrescentado 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico a 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se, a seguir, o sobrenadante. Acrescentamos então 1000µl de etanol a 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi então desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material foi, em seguida, identificado e armazenado a -80°C. Após este passo foi seguido o protocolo para purificação do RNA utilizando o Kit mirVana para extração do RNA, segundo as recomendações do fabricante.

3.6.2 Quantificação das amostras de RNA total

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria através do equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de uma razão referentes às amostras. Consideramos apenas as amostras com valores $> 1,8$ e $< 2,0$ (razão 260/280). Para valores menores do que 1,8 considerou-se que o material estivesse degradado, e para valores maiores do que 2,0 pode ter havido interferência do clorofórmio. Portanto, consideramos uma boa amostra àquelas compreendidas na faixa de 1,81 a 1,99.

A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel através do equipamento 2100 Bioanalyzer Instruments (Agilent Technologies) e foram consideradas adequadas as amostras com RIN>7,0.

3.7 Expressão dos gene analisados

3.7.1 Obtenção do cDNA

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante para a síntese do cDNA (DNA complementar). Para cada 1µl de RNA, adicionou-se 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0 µl de dNTP's; 2,5µl de Random Primers e 1,25µl da enzima MultiScribe™, completando com água DEPC para um volume final de 20µl. Em seguida, o material foi levado ao termociclador nas condições padrão (30 minutos à 16 °C para efetuar a desnaturação do DNA, 30 minutos à 42 °C para a extensão da cadeia, 5 minutos à 85 °C para a desativação da enzima e, em seguida, à 4 °C), onde o cDNA foi sintetizado a partir do RNA das amostras.

3.7.2 Análise da expressão genética pela técnica de PCR quantitativo em tempo real

O método de PCR em tempo real é utilizado para a confirmação da expressão diferencial. A partir do cDNA obtido das amostras, é realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems).

Para a análise quantitativa da expressão dos genes HIF1a, HIF2a, Ca9, ALDH1, Slug e Sox 9 foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay-on-demand, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems) (Tabela1).

Tabela 1: Sondas de cDNA dos genes estudados (HIF1a, HIF2a, Ca9, ALDH1, Slug e Sox9) e dos genes house-keepings (Tbp e Hprt)

HIF1a	Mm0468869_m1
HIF2a	Mm01236112_m1
Ca9	Mm00519870_m1
ALDH1a1	Mm00657317_m1
Slug (Snail2)	Mm00441531_m1
Sox9	Mm00448840_m1
Tbp	Mm00446971_m1
Hprt	Mm01545399_m1

Realizamos a quantificação relativa dos genes, onde as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata, utilizando o reagente Taqman Master Mix (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi realizada em um volume final de 10µl, utilizando 5µl do reagente específico Taqman Máster Mix, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real QuantStudio Flex 12k (Applied Biosystems) foi utilizado. As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de ΔCT .

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT (thresholdcycle) determinados para as diferentes amostras, foram normalizados. O CT determinado para um determinado gene foi subtraído do CT determinado para um gene house-keeping, na mesma amostra, originando o chamado ΔCT . Os valores de ΔCT podem, para um mesmo gene, serem comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT do calibrador tem como resultado o $\Delta\Delta CT$, que neste caso utilizou-

se a média das amostras do grupo controle. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, foi obtida, de forma aproximada, aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Quantificação Absoluta- Modelo de Curva Controle

Grafico 1. Quantificação Absoluta –RT PCR- Extraído de “Caracterização funcional de genes diferencialmente expressos em bibliotecas de SAGE”- Fernando Colibari do Amaral

Quantificação Relativa- Modelos matemáticos

Grafico 2. Quantificação Relativa- RT- PCR- Extraído de “Caracterização funcional de genes diferencialmente expressos em bibliotecas de SAGE”- Fernando Colibari do Amaral.

3.8 Análise estatística

A análise da expressão de ALDH1, marcadores de hipóxia tumoral e dos fatores de transcrição Slug e Sox 9, em relação ao grupo controle, foi realizada através da aplicação do teste *t de Student's*.

O software JMP, versão 7.0.2, SAS, e o MedCalc, versão 12.1.4, foram utilizados para a análise estatística. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Indução de hipóxia tumoral por isquemia renal - Necrose tubular aguda renal

Nós analisamos a histologia renal dos camundongos após o alotransplante de 67NR que foram submetidos a isquemia renal intermitente por 1 hora. Observamos que, após sete dias, havia uma evidente e difusa necrose tubular aguda (NTA) (Figura 9). Não houve evidência histológica de NTA nos grupos controles (Figura 10).

Figura 9. NTA em córtex renal de camundongo submetido ao aloenxerto de linhagem 67 NR, após 7 dias da hipóxia.

Figura 10. Linhagem 67NR de aloenxerto dentro do córtex renal após 7 dias no grupo controle.

4.2 Indução de hipóxia tumoral por isquemia renal- análise de marcadores de hipóxia tumoral

Para confirmar a isquemia direcionada ao rim e a presença de indutores de hipóxia tumoral, nós sacrificamos os camundongos após 24 horas e 7 dias da isquemia renal e micro-dissecamos os tumores do rim através de microcirurgia, utilizando-se microscópio (400x) e analisamos a expressão dos genes CA9, HIF1 alfa e HIF2 alfa, associados com hipóxia tecidual, utilizando a técnica de PCR em tempo real.

Comparando com o grupo controle, após 24 horas da isquemia renal, observamos um aumento de 2,9 vezes na expressão da CA9 ($p=0,001$), aumento de 2,1 vezes na expressão de HIF1a ($p=0,02$) e aumento de 2,6 vezes na expressão de HIF2a ($p=0,01$) na linhagem 67NR (Gráfico 3).

Gráfico 3. Expressão gênica de CA9, HIF1a e HIF2a tumoral no grupo de camundongos sacrificados após 24 horas de hipóxia. Comparação entre grupo submetido a isquemia, grupo controle e expressão gênica na linhagem celular 67 NR *in vitro*.

4.3 Expressão de Slug e Sox 9 e relação Slug/Sox9

Analizamos a expressão de SLUG, SOX9 e a relação SLUG/SOX9 no tumor renal, após 24 horas da isquemia tumoral, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Comparando com o grupo controle, observamos um aumento de 2,3 vezes na expressão de SLUG ($p=0,02$) e redução de 2,7 vezes na expressão do SOX9 ($p=0,005$) no grupo submetido a hipóxia. Além disso, observamos que a relação SLUG/SOX9 aumentou 5,7 vezes ($p=0,003$) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Expressão gênica de Slug e SOX9 tumoral e relação da expressão Slug/SOX9 no grupo de camundongos sacrificados após 24 horas de hipóxia. Comparação entre grupo submetido a isquemia, grupo controle e expressão gênica na linhagem celular 67 NR *in vitro*.

4.4 Expressão de ALDH1- marcador de células tronco tumorais (CTTs)

Avaliamos a expressão genética de ALDH1a1, com a técnica de PCR em tempo real. Foi avaliada a expressão após 24 horas de hipóxia tumoral e após 7 dias de hipóxia tumoral, comparando-os com seus controles. Não houve diferença de expressão entre o grupo sacrificado após 24 horas da hipóxia e seu controle ($p=0,13$). Porém, observou-se aumento de 2,1 vezes na expressão de ALDH1 no grupo sacrificado após 7 dias da hipóxia tumoral quando comparado ao grupo controle ($p=0,0003$) (Gráfico 5).

Gráfico 5. Expressão gênica de ALDH1 nos grupos sacrificados após 24 horas e após 7 dias da hipóxia. Relação Slug/Sox9 nos grupos sacrificados após 24 horas da hipóxia. Comparação entre grupo submetido a isquemia, grupo controle e expressão gênica na linhagem celular 67 NR *in vitro*.

4.5 Análise geral da expressão gênica do estudo

Observamos que houve aumento da expressão gênica de Ca9, HIF1A, HIF2A, Slug e da relação Slug/SOX9 após 24 horas da isquemia tumoral. Por outro lado, houve redução da expressão gênica de SOX 9 após 24 horas da isquemia tumoral.

Não houve aumento significativo da expressão gênica de ALDH1 após 24 horas da isquemia tumoral, porém houve aumentada após 7 dias da isquemia (Gráfico 6).

Gráfico 6. Expressão gênica relativa de Ca9, HIF 1a, HIF 2a, Slug, SOX 9, ALDH1 e relação Slug/SOX9 após hipóxia. Análise dos grupos submetidos a isquemia e sacrificados após 24h e após 7 dias. Utilizado como referência a expressão gênica da linhagem 67 NR *in vitro*.

5 DISCUSSÃO

As células tronco tumorais (CTTs) têm elevada capacidade de auto-renovação, mas requerem um ambiente específico para seu crescimento, que leva à proteção e à manutenção do estado de CTTs. A hipóxia tem sido relacionada com a modulação da população de CTTs e está associada com progressão tumoral e metástases (DAS et al., 2008; CONLEY et al., 2012).

Estudos recentes evidenciaram que Slug e Sox 9 estão envolvidos com transformação das células diferenciadas em fenótipo de células tronco, proliferação celular exacerbada e maior capacidade de desenvolver metástases em células tumorigênicas (GUO et al., 2012; FASILTY et al., 2015). Por isso, torna-se interessante avaliar sua correlação com o estado de hipóxia.

Entretanto, a hipóxia pode ser restrita a células dentro de um tecido, a um tecido dentro de um órgão específico ou ao organismo todo (CONLEY et al., 2012).

A modulação de CTTs pela hipóxia foi observada pelo grupo de Wicha, em 2012. Eles utilizaram droga antiangiogênica para estabelecer ambiente de hipóxia e foi observada tendência a aumento de células ALDH positivas, sendo estas, relacionadas com maior progressão tumoral. No entanto, quando utilizamos drogas antiangiogênicas em modelos xenográficos, promovemos hipóxia sistêmica, podendo ocorrer vieses na interpretação da ação específica de determinado gene.

É difícil quantificar o papel dos complexos fatores ambientais associados com a hipóxia no comportamento das CTTs usando modelos *in vivo*, devido aos desafios associados à individualização de outras interações ambientais com os efeitos da hipóxia na recorrência do câncer mediado por CTTs e metástases. O que alguns autores sugerem é o desenvolvimento de um modelo capaz de sistematizar a investigação da associação dos fatores relacionados com a hipóxia no comportamento das CTTs, para que possa levar a descoberta de alvos terapêuticos para impedir a ação das CTTs na recorrência tumoral e metástases (CROWDER et al., 2014).

Em nosso estudo, utilizamos um modelo *in vivo* de hipóxia tumoral direcionada, visando excluir fatores não decorrentes do processo de hipóxia que pudessem interferir na interpretação dos resultados obtidos. Desta forma, inserindo um clamp de aneurisma no hilo renal para hipóxia tumoral renal, tentamos evitar possíveis

associações com alterações sistêmicas que pudessem ser, concomitantemente, responsáveis pelas alterações evidenciadas no estudo. Ou seja, a hipóxia localizada promove maior acurácia aos resultados, podendo-se sugerir, com maior precisão, que as alterações evidenciadas neste estudo sejam decorrentes especificamente da hipóxia.

Além disso, para melhor avaliação da ação direta da hipóxia sobre a progressão tumoral, utilizamos a linhagem celular tumoral 67NR, sabidamente menos agressiva (ASLAKSON; MILLER, 1992; Lou et.al, 2008). Em linhagens agressivas, a progressão e a disseminação podem dever-se a características intrínsecas tumorais.

Evidenciamos aumento na expressão de ALDH1 no grupo sacrificado após 7 dias da hipóxia tumoral quando comparado ao grupo controle, porém, não houve diferença estatística entre a expressão gênica do grupo submetido a hipóxia e o controle quando avaliamos o grupo sacrificado 24 horas após a hipóxia. Este achado mostra que a hipóxia localizada pode levar a maior concentração de CTTs e, conseqüentemente, pode aumentar o poder de progressão, disseminação e agressividade tumoral (GINESTIER et al., 2007; TANEI et al., 2009; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2010; GONG et al., 2010; CONLEY et al., 2012). Entretanto, pode ser necessário um tempo determinado para que ocorra a formação de CTTs, decorrente do estímulo da hipóxia.

O aumento da expressão de HIF1A e HIF2A, corrobora achados anteriores de que estes fatores participam da homeostase do oxigênio (SEMENZA; WANG, 1992; JIANG et al., 1996; RATCLIFFE et al., 1998; COWDER et al., 2014).

Observamos aumento da expressão destes genes no grupo e sacrificado 24 horas após hipóxia em relação ao seu controle. Desta forma, houve elevação precoce da expressão destes genes, o que esperávamos para que haja resposta a adaptação celular decorrente da hipóxia. Estudos relacionaram aumento da expressão de HIF com favorecimento ao estado de CTTs, maior capacidade de metástases e pior prognóstico tumoral (BOS et al., 2001; YOSHIMURA et al., 2004; WANG et al., 2014). Portanto, além de estarem envolvidos com a homeostase estes fatores de indução da hipóxia podem estar envolvidos com a transformação de células diferenciadas em CTTs e podem ser um possível alvo para tentativa de controle da evolução tumoral (KAYA et al., 2012; HARTWICH et al., 2013).

No entanto, estes genes estão envolvidos com outras vias de adaptação de células normais do organismo, dificultando a viabilidade de terapias específicas para as células tumorais.

Observamos aumento da expressão de Ca9 no grupo sacrificado 24 horas após a hipóxia em relação ao seu controle, o que segundo alguns estudos favoreceria a formação de CTTs e pode ser um possível alvo de terapias para tentativa de melhorar prognóstico tumoral e sobrevida das pacientes (LOCK et.al, 2012; SPENCER et.al, 2014).

Os fatores de transcrição Slug e SOX9 são considerados importantes promotores do estado de célula tronco em células mamárias e em células de câncer de mama. Em modelos murinos em que Slug e SOX9 são superexpressos, células lumbais diferenciadas poderiam se converter em células tronco mamárias ou células tronco tumorais, poderia haver formação de esferas e há favorecimento a maior potencial de disseminação e metástases (GUO et al.,2012).

Nosso estudo observou aumento da expressão gênica de Slug no grupo submetido a hipóxia e sacrificado 24 horas após a isquemia, em relação ao grupo controle. De acordo com Guo et.al (2012) e Fasilaty et al. (2015), esta superexpressão seria favorável a formação de CTTs.

Por outro lado, observamos redução da expressão de SOX9 no grupo submetido a hipóxia e sacrificado após 24 horas da isquemia, em relação ao grupo controle, contrariando achados de Guo et al. (2012) e Fasilaty et al. (2015), que evidenciaram que o aumento da expressão gênica de SOX9 na presença de aumento da expressão gênica de Slug promove o aumento de células tronco tumorais em determinado ambiente. Esta redução da expressão gênica de SOX9 ocorrida em ambiente de hipóxia poderia colaborar para redução da formação de CTTs a partir de células diferenciadas, de acordo com os estudos que defendem a ação concomitante dos genes Slug e SOX9 para gerar o estado de célula tronco tumoral.

Entretanto, não está claro se a atividade de Slug depende da atividade de SOX 9 ou se ambos apenas agem simultaneamente, colaborando para mudanças no ambiente que facilite sua efetividade. Talvez SOX9 promova auto-renovação celular a partir de interações que decorram de programa de transcrição promovido por Slug (FASILATY et al.,2015).

Evidenciamos aumento da relação da expressão Slug/SOX9 no grupo submetido a hipóxia e sacrificado após 24 horas da isquemia. Podemos relacioná-lo

com o aumento da expressão de ALDH1 no grupo submetido a hipóxia e sacrificado após 7 dias da isquemia e, portanto, ressaltar a possibilidade de associação da relação entre expressão Slug/SOX9 com favorecimento ao estado de CTT, assim como estudo recente mostrou (GUO et al.,2012).

De acordo com estes achados, podemos relacionar os fatores de transcrição Slug e SOX9 com a tendência a formação de CTTs. Observamos o aumento da concentração de Slug e relação Slug/SOX 9 precocemente ao aumento da concentração de células ALDH positivas, que ocorreram apenas após 7 dias da hipóxia. Desta forma, quando o tumor é submetido a isquemia, Slug e SOX 9 podem estar envolvidos nas vias que propiciam a formação de CTTs.

A importância da avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição Slug e Sox9 deve-se à necessidade de determinação de possíveis alvos para novas terapias para o câncer de mama, já que estudos anteriores mostraram que a co-expressão destes genes pode levar à formação de CTTs.

O mecanismo de resistência das CTTs ao tratamento do câncer de mama, as faz um difícil alvo de tratamento. Entretanto, as vias responsáveis pela auto-renovação celular das CTTs necessitam ser melhor estabelecidas. Muitas vias são identificadas, mas se sobrepõe às usadas pelas células tronco normais, o que demonstra uma barreira ao tratamento direcionado às CTT (McDERMOTT SP; WICHA MS, 2010).

Como a hipóxia propicia ambiente com maior concentração de CTTs, tende a ocorrer maior agressividade tumoral quando presente e a provocar maior resistência à terapêutica. Estudos com análise do ambiente de hipóxia tumoral podem elucidar as possíveis vias envolvidas com a formação das CTTs e identificar possíveis alvos para o tratamento do câncer de mama.

6 CONCLUSÕES

Este estudo observou que a isquemia tumoral, utilizando modelo murino com implantação de clamp de aneurisma no hilo renal, foi efetiva em determinar hipóxia em tumor gerado a partir da inoculação de células da linhagem 67 NR em parênquima renal.

Verificou-se que a hipóxia pode levar a aumento de CTTs, pois houve aumento da expressão gênica de ALDHA1 após 7 dias da isquemia, propiciando alteração no fenótipo tumoral.

Além disso, com a hipóxia tumoral direcionada, houve elevação da expressão gênica de fatores de indução de hipóxia (Ca9, HIF1A, HIF2A) e de fatores de transcrição (Slug e relação Slug/SOX9), 24 horas após a isquemia.

Como foi evidenciado que há elevação de Slug e da relação Slug/SOX9, previamente ao aumento da expressão de marcador de CTTs, sugere-se que estes fatores de transcrição possam estar envolvidos no processo de formação de CTTs e possam ser futuros alvos terapêuticos. No entanto, ao observarmos a redução da expressão de SOX9 24 horas após isquemia, ressalta-se a importância de compreendermos melhor a atuação destes genes no processo de transição para CTTs, para que se possa desenvolver terapias específicas para o câncer de mama.

7 REFERÊNCIAS

Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:1154-1159.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 3983–8.

Antonio HMR, Mandarano LRM, Coelho AA, Tiezzi MG, Andrade JM, Tiezzi DG. Mouse renal 4T1 cell engraftment as a model to study the influence of hypoxia in breast cancer progression. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2013; 28(2): 142-147.

Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1992; 52: 1399-1405.

Bindra RS, Gibson SL, Meng A, Westermarck U, Jasin M, Pierce AJ et al. Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs. *Cancer Res.* 2005; 65: 11597–11604.

Bomken S, Fiser k, Heidenreich O, Vormoor J. Understanding the cancer stem cell. *British Journal of Cancer.* 2010; 103 (4): 439-45.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukaemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3: 730–737.

Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 309-314.

Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 1996; 56:941–943.

Cariati M, Naderi A, Brown JP, Samlley MJ, Pinder SE, Caldas C et al. Alpha 6 integrin is necessary for the tumourigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer.* 2008; 122(2): 298-304.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in câncer and other diseases. *Nature*. 2000; 407: 249-257.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Lovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B et al. Aldehyde Dehydrogenase 1- Positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast câncer. *Clin cancer Res*. 2009; 16(1): 45-55.

Côme C, Magnino F, Bibeau F, De Santa Barbara P, Becker KF, Theillet C et al. Snail and Slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 5395-5402.

Correia AL, Bissell MJ. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist Updat*. 2012; 15(1-2): 39-49.

Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath NA et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(8): 2784-9.

Crowder SW, Balikov DA, Hwang YS, Sung. Cancer Stem Cells under Hypoxia as a Chemoresistance Factor in Breast and Brain. *Curr Pathobiol Rep*. 2014; 2(1): 33–40.

Da Silva L, Parry S, Reid L, Keith P, Waddell N, Kossai M et al. Aberrant expression. Of E-cadherin in lobular carcinomas of breast. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32 :773-783.

Das B, Tsuchida R, Malkin D, Koren G, Baruchel S, Yeger H. Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. *Stem Cells*. 2008; 26: 1818–1830.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ et al. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003; 17: 1253-1270.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Bifoni M, Di Virgilio A et al. Identification and expansion of tumorigenic lung câncer stem cell population. *Cell Death Differ*. 2008; 15: 504-514.

Evans SM, Koch CJ. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Lett*. 2003; 195:1–16.

Fazilaty H, Gardaneh M, Akbari P, Zekri A, Behnam B. SLUG and SOX9 Cooperatively Regulate Tumor Initiating Niche Factors in Breast Cancer. *Cancer Microenvironment*. First online: 28 September 2015. Cited in Pubmed; PMID: 26412079.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple negative breast câncer. *N Engl J Med*. 2010;363(20): 1938-1948.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5): 555-567.

Gong C, Yao H, Liu Q, Chen J, Shi J, Su F et al. Markers of tumor initiating cells predict chemoresistance in breast câncer. *PLoS One*. 2010; 5(12): e 15630.

Guo W, Keckesova Z, Donahe JL, Shibue T, Tischler V, Reinhanalt F et al. *Cell*. 2012; 148: 1015-1028.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 1996; 379:88–91.

Halder G, Callaerts P, Gehring WJ. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science*. 1995; 267, 1788–1792.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86(3) :353–364.

Hartwich J, Orr WS, Ng CY, Spence Y, Morton C, Davidoff AM. HIF-1 α activation mediates resistance to anti-angiogenic therapy in neuroblastoma xenografts. *J. Pediatr. Surg*. 2013; 48: 39-46.

Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker of normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*. 2009; 69: 3382-3389.

He C, Sun XP, Qiao H, Jiang X, Wang D, Jin X et al. Downregulating hypoxia-inducible factor-2 α improves the efficacy of doxorubicin in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2012; 103: 528-534.

Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2004; 104 (6): 1648–1655.

Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996; 56: 4509–4515.

Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Rio de Janeiro; 1996-2015. [atualizado 2015; citado 2016 jan. 10]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. *Cancer Statistics, CA Cancer J Clin.* 2010.

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; 271: 17771-17778.

Kaya AO, Gunel N, Benekli M, Akyurek N, Buyukberber S, Tatli H et al. Hypoxia inducible factor-1 α and carbonic anhydrase IX overexpression are associated with poor survival in breast cancer patients. *J. BUON.* 2012; 17: 663-668.

Kasai T, Chen L, Mizutani A, Kudoh T, Murakami H, Seno M. Cancer Stem Cells Converted from Pluripotent Stem Cells and the Cancerous Niche. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine.* 2014; 10(1): 2-6.

Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ. Targeting the tumor microenvironment. *Front Biosci.* 2007; 12: 3468-74.

Kryezek I, Liu S, Roh M, Vatan L, Szeliga W, Wei S et al. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *Int. J. Cancer.* 2012; 130: 29-39.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; 67:1030-1037.

Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y et al. Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports.* 2014; 2(1): 78–91.

Lou Y, Preobrazhenska O, auf dem Keller U, Sutcliffe M, Barclay L, McDonald PC et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. *Developmental Dynamics.* 2008; 237: 2755-2768.

Lock FE, McDonald PC, Lou Y, Serrano I, Chafe SC, Ostlund C, et al. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene.* 2013; 31; 32(44): 5210-9.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4): 704-15.

Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer*. 2012; 12 :323–334.

McDermott SP; Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol*. 2010; 10:574-7891.

Mihaylova VT, Bindra RS, Yuan J, Campisi D, Narayanan L, Jensen R et al. Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 3265–3273.

Moon EJ, Brizel DM, Chi JT, Dewhirst MW. The potential role of intrinsic hypoxia markers as prognostic variables in cancer. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9: 1237–1294.

Morrison BJ , Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast cancer research*. 2008; 10(4): 210.

Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Akslen LA. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumors in african breast cancer. *Br J Cancer*. 2010; 102(2): 369-375.

Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC. et al. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-caderin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*. 2008; 22: 2085-2098.

Pawlus MR, Wang L, Ware K, Hua CJ. Upstream Stimulatory Factor 2 and Hypoxia-Inducible Factor 2(HIF2). Cooperatively Activate HIF2 Target Genes during Hypoxia. *Mol. Cell. Biol*. 2012; 32 (22):4595-4610.

Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24 (-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Nat Cancer Institute*. 2006; 98(24): 1777-1785.

Pomp V, Leo C, Mauracher A, Korol D, Guo W, Varga Z. Differential expression of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in intrinsic subtypes of breast câncer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015; 154:45–55

Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006; 441:437–443.

Prasad CP, Rath G, Mathur S, Bhatnagar D, Parshad R, Ralhan R. Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK 3 beta in invasive ductal carcinoma of breast. *BMC Cancer*. 2009; 9: 325.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Nat Acad.Sci.USA*. 2007; 104: 973-978.

Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol*. 1998; 201:1153-1162.

Razzak AR, Lin NU, Winer EP. Heterogeneity of breast cancer and implications of adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer*. 2008; 15: 31-34.

Reya T et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414 (6859):105-11.

Rofstad EK. Microenvironment-induced cancer metastasis. *Int J Radiat Biol*. 2000; 76: 589–605.

Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992; 12: 5447-5454.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359(6398): 843–845.

Storci G, Sansone P, Trere D, Tavorari S, Taffurelli M, Ceccarelli C, et al. The basal like breast carcinoma phenotype is regulated by Slug gene expression. *Pathol*. 2008; 214: 25-37.

Subarsky P, Hill RP. The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20: 237–250.

Swietach P, Hulikova A, Vaughan-Jones RD, Harris AL. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene*. 29(50): 6509–6521.

Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Tagushi T et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with

resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2009;15(12): 4234-41.

Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science.* 1988; 242, 405–411.

Tomao F, Papa A, Strudel M, Rossi L, Russo GL, Panici PB et al. Investigating Molecular Profiles of Ovarian Cancer: An Update on Cancer Stem Cells. *J Cancer.* 2014; 5(5): 301-310.

Valejo F, Tiezzi DG, Marana HRC, Clagnan WS, Benevides L, Carrara HHA et al. Cancer stem cells and lymph node metastasis in early stage breast cancer. *Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.* 2010.

Wang Y, Li Z, Zhang H, Jin H, Sun L, Dong H et al. HIF-1 α and HIF-2 α correlate with migration and invasion in gastric cancer. *Cancer Biol. Ther.* 2010; 10: 376-382

Wang HX, Qin C, Han FY, Li N. HIF 2 alfa a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *Genet. Mol. Res.* 2014;13 (2): 2817-2826.

Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J.* 2003; 17: 503–505.

Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/ CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Resource.* 2008; 10(1): R10.

Xue X, Taylor M, Anderson E, Hao C, Qu A, Greenson JK et al. Hypoxia-inducible factor-2 α activation promotes colorectal cancer progression by dysregulating iron homeostasis. *Cancer Res.* 2012; 72: 2285-2293.

Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85: 9533–9537.

Yoshimura H, Dhar DK, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S et al. Prognostic Impact of Hypoxia-Inducible Factors 1 α and 2 α in Colorectal Cancer Patients. Correlation with Tumor Angiogenesis and Cyclooxygenase-2 Expression. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 8554.

Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(3): 795-801.

Zhu GQ, Tang YL, Li L, Zheng M, Lianq J, Li XY et al. Hypoxia inducible factor 1 α and hypoxia inducible factor 2 α play distinct and functionally overlapping roles in oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 4732-4741.