

Declaro não haver nenhum conflito de
interesse.

Novo modelo *in vivo* de hipóxia de câncer de mama revelando mudanças na transição epitélio-mesênquima



Lombardi W, Sicchieri RD, Antonio HMR,
Menani PCR, Andrade JM, Tiezzi DG



INTRODUÇÃO



- Baixos níveis de O₂ intracelular caracterizam muitos TU
- ↑ a população de CTT
- Modula a expressão de genes que determinam um fenótipo mais agressivo e menos diferenciado:
 - Predispondo a invasão
 - Disseminação tumoral

INTRODUÇÃO



- Um dos mecanismos que intensificam a disseminação é a **TEM**
- Aquisição de características migratórias capacitariam a invasão das células tumorais:
 - Perda de propriedades epiteliais
 - Ganho de propriedades mesenquimais

INTRODUÇÃO CONTROVÉRSIAS



- Associação entre hipóxia e fenótipos mais agressivos
- Modelos experimentais (limitados)
 - Modelos *in vitro*
 - Modelos *in vivo*
 - Camundongos submetidos à hipóxia sistêmica
 - Uso de drogas indutoras de hipóxia



OBJETIVO

- Analisar a influência da hipóxia transitória na expressão de genes envolvidos na TEM através de um um novo modelo *in vivo* de hipóxia de câncer de mama

- | | | |
|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| – CDH ₁ | - SOX ₉ | - NOTCH ₁ |
| – VIM | - TGFB ₁ | - CA-IX |
| – FN ₁ | - TWIST ₁ | - SNAIL ₂ (Slug) |
| – CTNNB ₁ | - HIF _{1A} | - HIF _{2A} |

MÉTODOS



- Trabalho prospectivo
- Aprovado pelo COBEA: nº 099/2012
- Cultura de células
 - Linhagem de câncer de mama murino 4T1 e 67nr
 - 10^5 células vivas (exclusão com o azul de tripan)
- Animais de experimentação
 - Camundongos da linhagem BALB/c



MÉTODOS

- **Cirurgia**

- Anestesia com Ketamina + Xilazina i.p.
- Incisão paramediana dorsal
- Identificação do rim esquerdo
- Injeção de células no parênquima renal (seringa de insulina c/ agulha de 30G)
- Sutura por planos

Acta Cir Bras: 2013 Feb;28(2):142-7.

Mouse renal 4T1 cell engraftment as a model to study the influence of hypoxia in breast cancer progression.

[Antonio HM, Mandarano LR, Coelho AA, Tiezzi MG, Andrade JM, Tiezzi DG.](#)



MÉTODOS

- **Isquemia renal**
- 7 dias após o transplante: nova cirurgia
 - Anestesia com Ketamina + Xilazina i.p.
 - Incisão paramediana abdominal
 - Identificação do rim esquerdo e hilo renal
 - Clampeamento do hilo com clip de aneurisma cerebral (60 minutos)
 - Retirada do clip
 - Sutura por planos

Acta Cir Bras: 2013 Feb;28(2):142-7.

Mouse renal γ T1 cell engraftment as a model to study the influence of hypoxia in breast cancer progression.

[Antonio HM, Mandarano LR, Coelho AA, Tiezzi MG, Andrade JM, Tiezzi DG.](#)

MÉTODOS



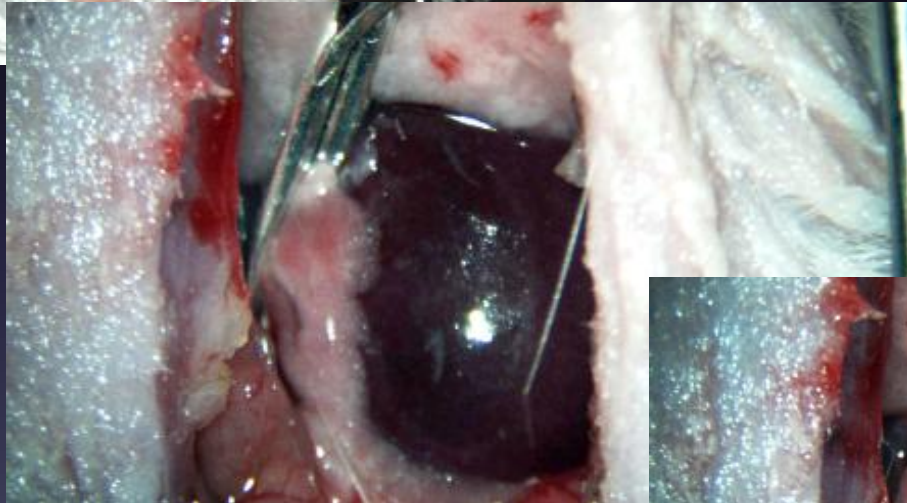
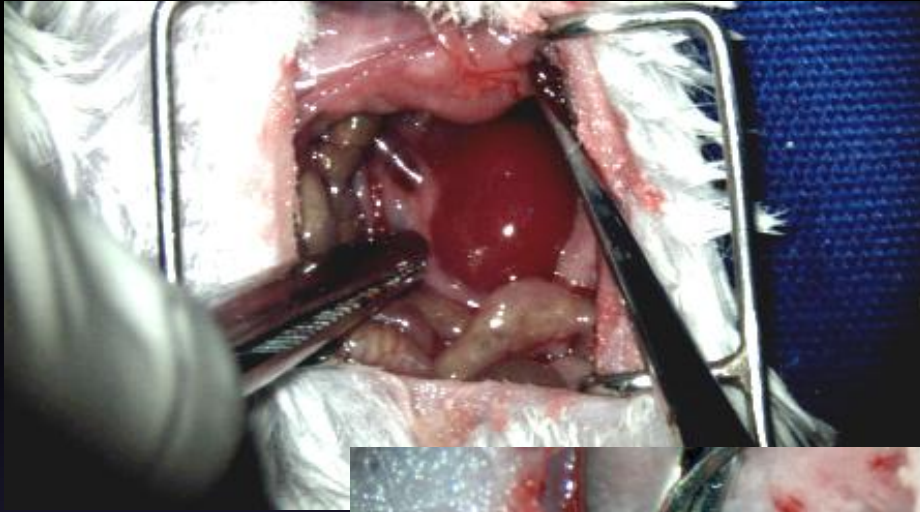
MÉTODOS



MÉTODOS



MÉTODOS

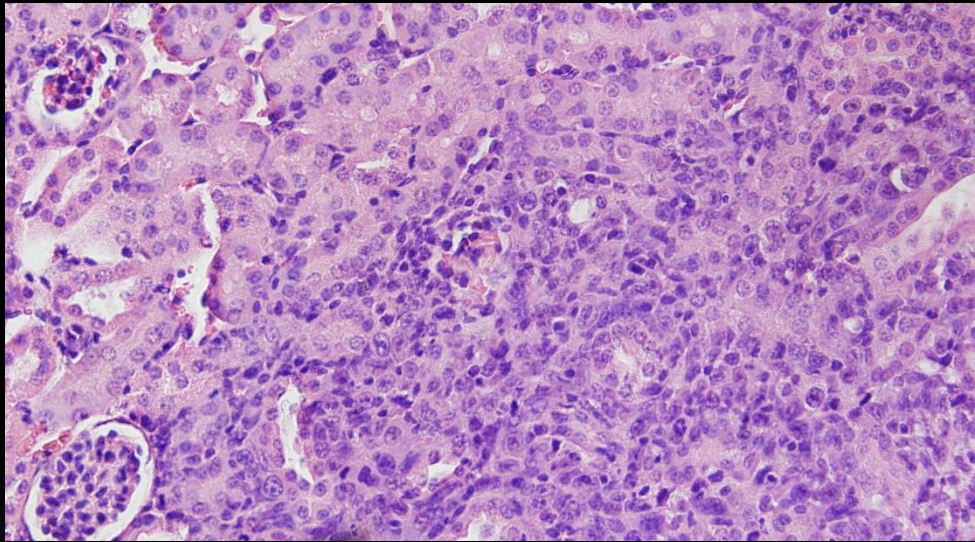


MÉTODOS

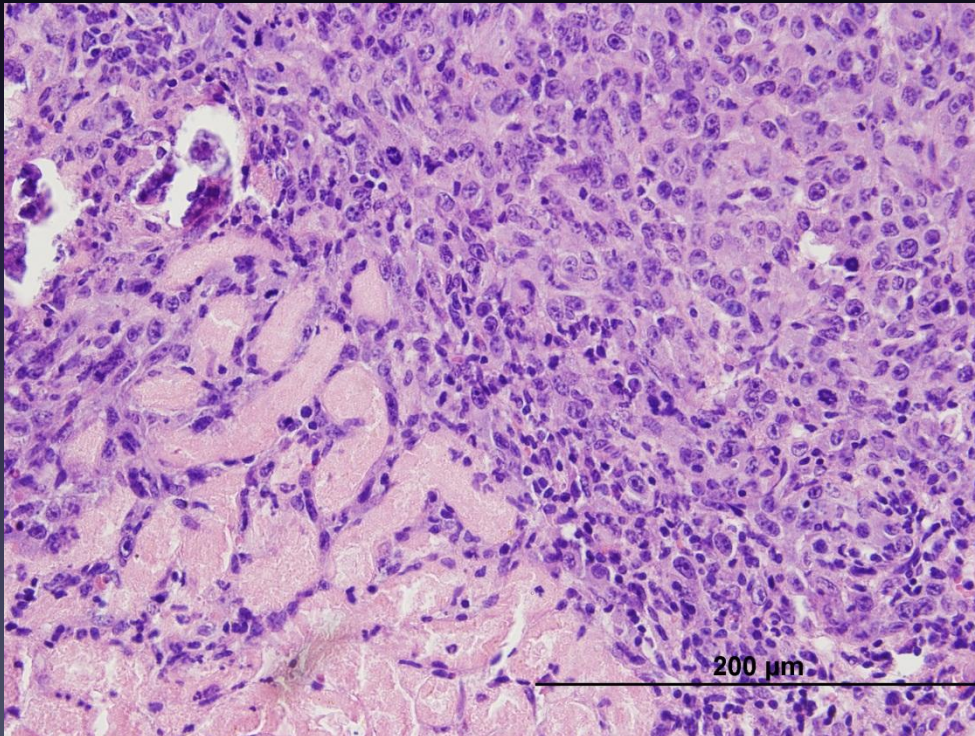


Grupos com alotransplante de 4T₁ e 67nr

- **Grupo controle - 12 animais (cirurgia simulada)**
 - Sacrificados dia 14 e 28 após transplante
- **Grupo com hipóxia - 12 animais (cirurgia com clamp)**
 - Sacrificados dia 14 e 28 após transplante
- Análise histológica das mudanças morfológicas induzidas pela isquemia
- Análise do potencial metastático para pulmões e fígado



4T1 aloenxerto dentro do córtex renal após 14 dias da inoculação no grupo controle



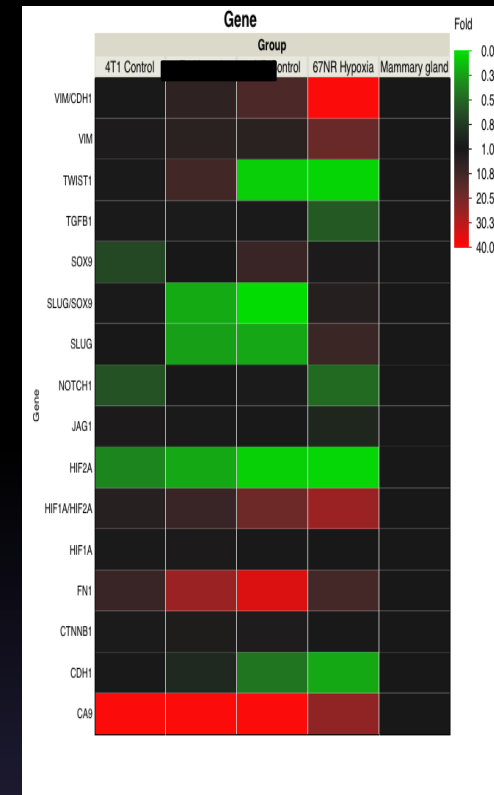
4T1 aloenxerto dentro do córtex renal após 14 dias da inoculação no grupo com hipóxia. A necrose tubular aguda é evidente.

MÉTODOS

- Foram analisados as expressões gênicas após 14 dias da inoculação

- RT-PCR em tempo real**

- CDH₁ - SOX₉ - NOTCH₁
- VIM - TGFB₁ - CA-IX
- FN₁ - TWIST₁ - SNAIL₂(Slug)
- CTNNB₁ - HIF₁A - HIF₂A



- TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)
- O Ct (thresholdcycle) foi calculado utilizando 3 amostras de cada linhagem com 25 ng de RNA
- O TATA boxbindingprotein (TBP) foi utilizada como o controle do RNA endógeno
- O tecido mamário normal do camundongo foi utilizado como referência
- Utilizou-se o software JMP 7.0 SAS para análise dos dados

RESULTADOS

- Todos os camundongos inoculados desenvolveram tumor no local
- Não foram observados metástases hepática

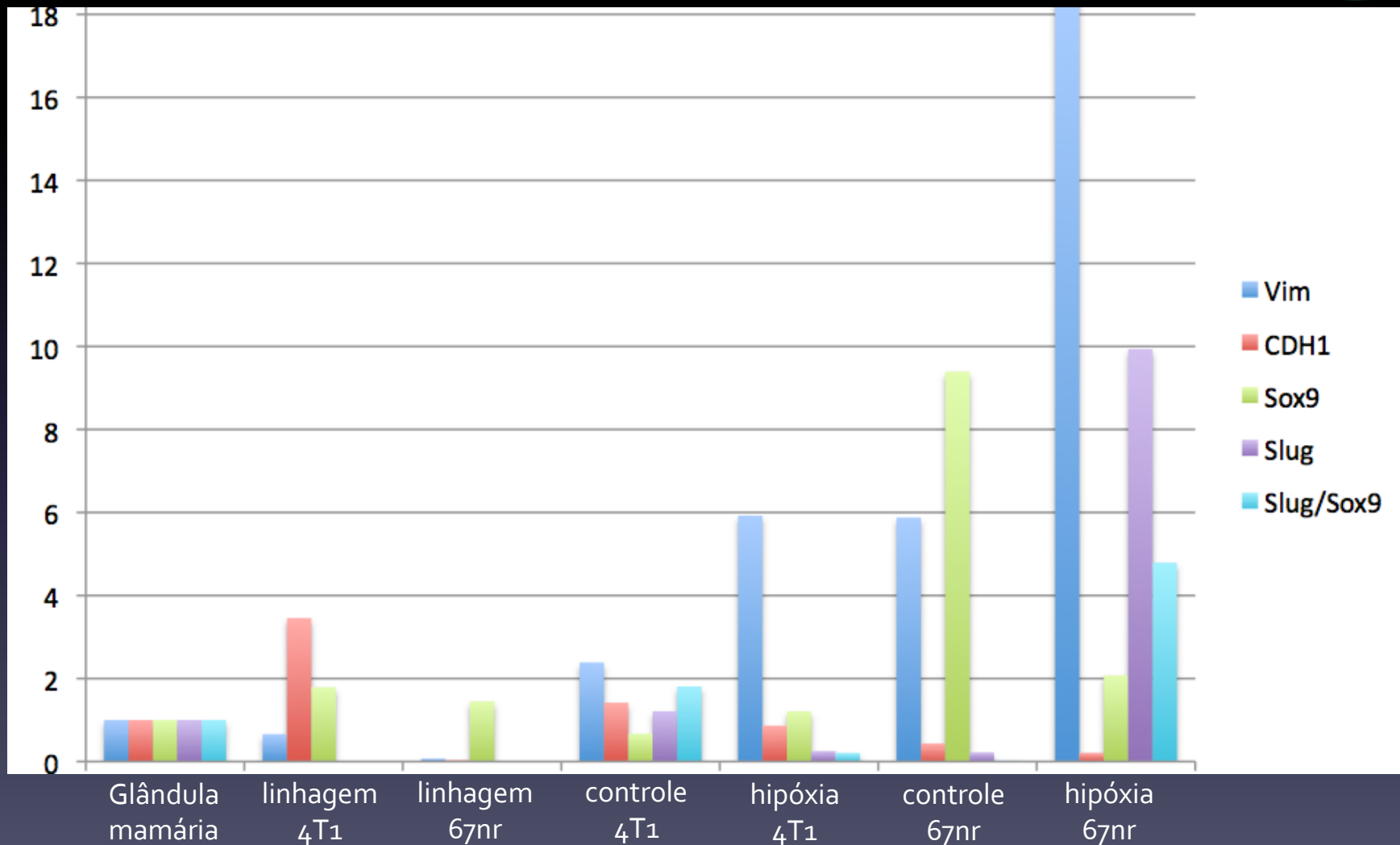
Presença de metástase pulmonar		
Linhagem	Grupos	
67nr	Controle	Hipóxia
7 dias	1/6	3/6
21 dias	2/6	5/6
4T1		
7 dias	0/4	2/4
21 dias	4/4	4/4

RESULTADOS



- **Análise da expressão gênica:**
 - Todos foram expressos diferentemente após a inoculação
- **Controle x Hipóxia:**
 - Aumento significativo de 2,6 e 3,1 vezes na expressão de VIM (4T1 e 67nr)
 - Diminuição de 0,51 e 0,53 vezes na expressão de CDH1
- **No grupo 67nr:**
 - A expressão de **SLUG** aumentou **496** vezes
 - A taxa de **SLUG/SOX9** aumentou **4,8** vezes
- A expressão de HIF1A/HIF2A aumentou nas duas linhagens após a hipóxia

RESULTADOS



CONCLUSÃO



- A hipóxia dirigida do sítio tumoral no modelo *in vivo* induz a TEM e potencializa a disseminação metastática do câncer de mama murino
- O aumento da expressão de SLUG sugere ser um fator de transcrição importante na indução da TEM na presença de hipóxia

OBRIGADO



CONTATO: wellom@terra.com.br