

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITO DA HIPÓXIA INTERMITENTE EM MARCADORES DE PROGRESSÃO DE
MELANOMA EM UM MODELO DE APNEIA DO SONO EM CAMUNDONGOS

Dissertação de Mestrado

SILVANA PERINI

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITO DA HIPÓXIA INTERMITENTE EM MARCADORES DE PROGRESSÃO DE
MELANOMA EM UM MODELO DE APNEIA DO SONO EM CAMUNDONGOS

SILVANA PERINI

Orientador: Professor Dr. Denis Martinez

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito para obtenção de título de
Mestre.

Porto Alegre, fevereiro de 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Perini, Silvana

EFEITO DA HIPÓXIA INTERMITENTE EM MARCADORES DE
PROGRESSÃO DE MELANOMA EM UM MODELO DE APNEIA DO
SONO EM CAMUNDONGOS / Silvana Perini. -- 2013.
92 f.

Orientador: Denis Martinez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Câncer. 2. Marcadores Tumorais. 3. KI-67. 4.
PCNA. 5. Melanoma Experimental. I. Martinez, Denis,
orient. II. Título.

Dedico à família,
especialmente aos pais, Danilo e Ester,
e ao esposo, Marcelo,
pelo incondicional apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Expresso meu profundo agradecimento a todos aqueles que contribuíram de alguma forma e em diferentes níveis ao longo da minha trajetória até esse momento, que culmina na conclusão de mais uma etapa em minha vida acadêmica.

Inicialmente, manifesto minha gratidão ao meu orientador, Denis Martinez, maior incentivador de meu ingresso no mestrado. Somos a soma de nossas decisões e, sem este primeiro empurrão, tenho certeza de que não estaria hoje aqui. A ele sou grata pelo suporte, pelas contribuições, e pela grande oportunidade de aprendizado e de crescimento como cientista.

A conclusão deste mestrado não teria sido possível sem o incansável apoio e paciência do meu amor e maior companheiro, Marcelo Benvenuti Trombetta, a quem muito agradeço pela confiança que depositou em mim nos momentos de ausência, pelas palavras de conforto nos momentos de preocupação e pelos sorrisos que conseguiu arrancar de meu rosto nas situações de angústia.

Agradeço, também, o estímulo, incentivo e conforto da minha tão amada família. Meus pais queridos, Danilo e Ester, meus irmãos, Rosângela e Narciso, meus cunhados, Deise e Manuel, meus sobrinhos, Antônia, Gabriel e, em especial, Priscila, a quem consegui passar o quão gratificante é ser um profissional da saúde e contribuir com a vida do próximo. Família, mais uma vitória que conseguimos com nossa união!

Também agradeço a toda família de meu esposo pelo apoio e entendimento da ausência nos momentos familiares. Agradeço especialmente à Dona Eliana e ao Sr. Raul pelo acolhimento como mais uma filha em seu lar.

Aos colegas do grupo de pesquisa LIPES (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Sono) pela enorme colaboração e ajuda no desenvolvimento desta dissertação, em especial as queridas Luciana Vieira, Cintia Zappe Fiori e Carolina Montanari.

À Dra. Jane Mattei, Médica Oncologista, pela ajuda na revisão final da dissertação.

Aos idealizadores deste projeto de mestrado: Dra. Ana Lucia Abujamra, Dra. Cristina Bonorino, Marianne Oliveira, e novamente, Dr. Denis Martinez.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela viabilização da concretização do experimento animal.

Aos Médicos Patologistas, Dr. Denis Baronio, Dra. Maria Isabel Edelweiss e Dra. Luize Meurer, pelas análises de imuno-histoquímica.

Ao programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, ao Fundo de incentivo à Pesquisa (FIPE), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científicos e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e incentivo à pesquisa acadêmica.

“Cem vezes todos os dias lembro a mim mesmo que minha vida, interior e exterior, depende dos trabalhos de outros homens, vivos ou mortos, e que devo esforçar-me a fim de devolver na mesma medida que recebi.”

Albert Einstein

RESUMO

Objetivos do Estudo: O aumento do crescimento de melanoma foi avaliado em camundongos expostos a hipóxia intermitente. As proteínas que caracterizam a agressividade do tumor ainda não foram investigadas. O estudo teve como objetivo verificar se a hipóxia intermitente simulada pela apneia do sono afeta marcadores de melanoma na progressão tumoral.

Desenho: Estudo prospectivo controlado em animais.

Senário: Hospital Universitário.

Participantes: Doze camundongos C57BL/6.

Intervenções: Camundongos foram expostos a hipóxia intermitente ou simulada. Durante 8 horas por dia, o grupo hipóxia foi submetido a um total de 480 ciclos de 30 segundos de hipóxia progressiva SpO₂ nadir de $8 \pm 1\%$, seguidos por 30 segundos de normóxia. Um milhão de células de melanoma B16F10 foi injetado por via subcutânea. No dia 14, após a eutanásia, os tumores foram removidos, fixados e corados.

Médias e resultados: coloração imunohistoquímica de Ki-67, PCNA, S100-B, HMB-45, Melan-A, TGF, Caspase-1 e HIF-1 α foi quantificada por dois observadores que utilizaram captura digital e processamento em três lâminas de cada animal para cada marcador. O tamanho e o peso dos tumores foram semelhantes nas experiências de hipóxia e simulada. A percentagem da mediana [25-75 quartis] de área positiva corada para Ki-67 foi de 23% [15-28] no grupo hipóxia e 0,3% [0,2-1,1] no grupo controle ($P = 0,02$); para PCNA, as percentagens foram 31% [25-38] e 7% [5-18], respectivamente ($P = 0,009$). As diferenças entre os grupos para os marcadores restantes não foram significativas.

Conclusões: Os marcadores da transcrição do RNA ribossomal e da síntese de DNA são mais expressos em tumores de camundongos expostos a hipóxia intermitente do que em controles, indicando que a apneia do sono pode levar a uma maior agressividade do tumor.

Palavras-chave: Câncer, marcadores tumorais, KI-67, PCNA, antígenos associados a tumores, Melanoma Experimental.

ABSTRACT

Study Objectives: Increased melanoma growth has been reported in mice exposed to intermittent hypoxia. Proteins that characterize tumor aggressiveness have not been investigated. The study aims to verify whether intermittent hypoxia mimicking sleep apnea affects markers of melanoma tumor progression.

Design: Prospective controlled animal study.

Settings: University hospital.

Participants: Twelve C57bl/6 mice.

Interventions: Mice were exposed to intermittent or sham hypoxia. During 8 hours per day, the hypoxia group was submitted to a total of 480 cycles of 30 seconds of progressive hypoxia to a nadir FIO₂ of 8±1%, followed by 30 seconds of normoxia. One million B16F10 melanoma cells were injected subcutaneously. On the 14th day, after euthanasia, tumors were removed, fixed and stained.

Measurements and Results: Immunohistochemistry staining for Ki-67, PCNA, S100-B, HMB-45, Melan-A, TGFβ, Caspase-1 and HIF-1α was quantified by two observers using digital capture and processing in three slides from each animal for each marker. The size and weight of the tumors were similar in hypoxia and simulated experiments. Median [25-75 quartiles] percentage of positive area stained for Ki-67 was 23% [15-28] in the hypoxia group and 0.3% [0.2-1.1] the control group (P=0.02); for PCNA, the percentages were 31% [25-38] e 7% [5-18], respectively (P=0.009). The differences between the groups for the remaining markers were not significant.

Conclusions: Markers of ribosomal RNA transcription and of DNA synthesis are more expressed in tumors of mice exposed to intermittent hypoxia than of controls, indicating that sleep apnea can lead to greater tumor aggressiveness.

Keywords: Cancer, Tumor Markers, KI-67, PCNA, Tumor-Associated Antigens, Experimental Melanoma.

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Frequências ponderadas (%) e frequências relativas de gênero de queixas de sono encontradas nas pesquisas realizadas em 1987, 1995, e 2007, na cidade São Paulo. Adaptada referência 16.

Tabela 2 - Principais consequências da SAOS.

Tabela 3 – Seleção de genes-alvo HIF-1, cujos produtos contribuem para a progressão tumoral. Adaptada referência 70.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Hipnograma.

Figura 2 – Eletroencefalograma nos diferentes estágios do sono.

Figura 3 – Fluxo oronasal. Adaptada referência 28.

Figura 4 – Ilustração do esforço ventilatório toracoabdominal e ausência de fluxo aéreo no traçado de polissonografia.

Figura 5 – Critérios para diagnóstico da SAHOS.

Figura 6 – Prevalência da Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono em homens e mulheres. Adaptada referência 38.

Figura 7 - Imagem sagital, analisada por ressonância magnética de indivíduo normal e com apneia obstrutiva do sono. Adaptada referência 42.

Figura 8 – CPAP. Referência adaptada 62.

Figura 9 – Regulação das subunidades HIF- α pela disponibilidade de O₂ e outros metabólitos intracelulares. Adaptada referência 110.

Figura 10 - Estimativa de câncer nos EUA. Adaptada referência 76.

Figura 11 - Estimativa de câncer nos EUA. Adaptada referência 76.

Figura 12- O papel dos genes e do ambiente no desenvolvimento do câncer. Adaptada referência 79. **Figura 13** - Metabolismo energético. Adaptada referência 80.

Figura 14 – Obesidade, balanço energético e câncer: uma visão mecanicista. Adaptada referência 86.

Figura 15 - Visão tradicional dos HIFs na progressão tumoral. Adaptada referência 100.

Figura 16 - Genes ativados por fatores indutores de hipóxia (HIFs) envolvidos na progressão tumoral. Adaptada referência 110.

Figura 17 – A hipótese da fixação de oxigênio. Adaptada da referência 110

LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO EM INGLÊS

Figure 1. Immunohistochemistry slide, digital analyses of staining, and box-plots representing the percentage of area stained positive and intensity of staining, in sham (SIH) and intermittent hypoxia (IH) groups, of the markers (A) Ki-67 (B) PCNA. Box-plots representing the percentage of area stained positive and intensity of staining of markers: (C) caspase-1, (D) hypoxia inducible factor-1-alfa (HIF-1 α), (E) human melanoma black-45 (HMB-45), (F) melanoma antigen (Melan-A), (G) S100 beta protein (S100- β), (H) transforming growth factor beta (TGF- β). AU: arbitrary units.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: apneias e hipopneias

ACS: apneia central do sono

AOS: apneia obstrutiva do sono

CTMs: células-tronco mesenquimais

DNA: ácido desoxirribonucleico

EEG: eletroencefalograma

EMG: eletromiograma

EOG: eletro-oculograma

HI: hipóxia intermitente

HIF-1 α : fator 1-alfa induzível por hipóxia

HMB-45: anticorpo marcador de melanoma humano-45

IAH: índice de apneia e hipopneia

IDR: índice de distúrbio respiratório

Ki-67: antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67

Melan-A: antígeno de melanoma reconhecido por células-T1

O₂: oxigênio

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

PSG: polissonografia

RERAs: respiratory effort-related arousals (despertares esforço respiratório-relacionados)

S100-B: proteína B ligante de cálcio

SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono

SAHOS: síndrome das apneias e hipopneias obstrutivas do sono

SED: sono excessivo diurno

SpO₂: saturação de oxigênio

Sono NREM: Non Rapid Eye Movement (sono sem movimento rápido dos olhos)

Sono REM: Rapid Eye Movement (sono com movimento rápido dos olhos)

SNC: sistema nervoso central

TEM: transição de células epiteliais para mesenquimais

TGF- β : fatores de crescimento transformante beta

TRS: transtornos respiratórios do sono

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISAO DA LITERATURA.....	18
1.1 SONO	19
1.1.1 MEDINDO O SONO	22
2.1.2 TRANSTORNOS DO SONO	23
2.1.3 PREVALÊNCIA	29
2.1.4 PATOGÊNESE DA SAOS	31
2.1.5 REPERCUSSÃO DAS APNEIAS DO SONO NO ORGANISMO.....	32
2.1.6 TRATAMENTO	34
2.1.7 PAPEL DO FATOR 1-A INDUZIVEL POR HIPÓXIA	35
2.2 NEOPLASIAS.....	38
2.2.1 OBESIDADE COMO FATOR DE RISCO PARA NEOPLASIAS	41
2.2.2 HIPÓXIA E NEOPLASIAS.....	44
2.2.3 HIFS E REGULAÇÃO GENÉTICA	45
2.1.3 IMPLICAÇÕES TEREPEÚTICAS DA HIPÓXIA TUMORAL.....	49
2.3 HIPÓXIA INTERMITERENTE E CANCER.....	50
2.4 MELANOMA.....	51
2.5 BIOMARCADORES NO MELANOMA E NA HIPÓXIA	53
2.5.1 BIOMARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO MELANOCÍTICA.....	54
2.5.2 BIOMARCADORES DE PROLIFERAÇÃO TUMORAL	56
2.5.3 BIOMARCADOR DE PROGRESSÃO TUMORAL	57

2.5.4	BIOMARCADOR DE NECROSE TUMORAL E HIPÓXIA	57
2.5.5	BIOMARCADOR DE APOPTOSE.....	58
3.	JUSTIFICATIVAS.....	59
4.	OBJETIVOS.....	60
4.1	Geral.....	60
4.2	Específicos.....	60
5.	ARTIGO EM INGLÊS.....	79
5.1	TABELA E FIGURAS DO ARTIGO	88
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92

1. INTRODUÇÃO

Apneias e hipopneias do sono são perturbações respiratórias com duração superior a dez segundos e culminam em um despertar breve, não percebido pelo indivíduo. Estes transtornos respiratórios do sono acometem até um terço da população adulta em São Paulo. Durante a apneia, a saturação de oxigênio da hemoglobina no sangue arterial cai até que ocorra o despertar que encerrará o evento e normalizará a saturação.

Em função da hipóxia intermitente e dos múltiplos despertares, as apneias do sono afetam o sistema nervoso central e danificam o aparelho cardiovascular, via hipertensão arterial sistêmica e estresse oxidativo.

A obesidade é um dos fatores de risco para apneias obstrutivas do sono, e a associação entre obesidade e câncer é bem conhecida. Existem, porém, raras evidências ligando as apneias do sono ao câncer.

O fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF-1 α) controla processos biológicos normais, fundamentais para a regulação do oxigênio, mas também participa em vários aspectos da oncologia, como no metabolismo de tumores, angiogênese, metástases, inflamação e terapia do câncer. O entendimento de como as células respondem à hipóxia é essencial para o estudo do crescimento tumoral e de metástases.

O objetivo geral deste projeto é investigar o efeito da hipóxia intermitente, similar à observada na apneia do sono, sobre o comportamento de células neoplásicas. Mais especificamente, investigar-se-á o efeito da hipóxia intermitente isocápnica sobre o comportamento celular e sobre o comportamento molecular do melanoma, por avaliação imuno-histoquímica.

2. REVISAO DA LITERATURA

A estratégia de busca foi a seguinte: ao procurar por “sleep apnea” no PubMed, obtiveram-se 24323 referências; por “sleep apnea” e “cancer”, 172 referências; por “intermittent hypoxia”, 1339 referências. Quando adicionada a palavra “cancer” à expressão “intermittent hypoxia”, 23 referências foram encontradas; quando acrescentada a expressão “intermittent hypoxia” à palavra “melanoma”, encontraram-se 2 referências.

No Embase: ao buscar por “sleep apnea”, obtiveram-se 37260 referências; por “sleep apnea” e “cancer”, 1807 referências; por “intermittent hypoxia”, 1932 referências. Quando adicionada a palavra “cancer” à expressão “intermittent hypoxia”, 90 referências foram encontradas; quando acrescentada a expressão “intermittent hypoxia” à palavra “melanoma”, encontraram-se 7 referências, das quais apenas três se referem a modelo de apneia do sono.

1.1 SONO

Intermediário entre a vigília, estado ativo dos animais e de todas suas funções intelectuais, e a morte, suspensão total de todas as funções, o sono é um estado ativo e complexo, combinado por processos fisiológicos e comportamentais, que ocupa um terço de nossas vidas.¹ O comportamento do sono é dinâmico, mudando suas características em segundos. O controle do sono por mecanismos cerebrais envolve mais de uma dezena de sistemas neuroendócrinos interligados que se alternam entre os ciclos vigília-sono.

A adaptação dos organismos vivos ao ciclo dia-noite evoluiu com o surgimento do ciclo vigília-sono,² e persiste com ritmicidade biológica interna em ambientes naturais ou artificiais, conferindo características endógenas ao que chamamos de ciclo circadiano.³ A vigília ocorre antes do início do sono e ao despertar pela manhã, assim como em breves períodos, como quando se acorda durante o sono, entre cinco ou quinze vezes por hora, geralmente durante as trocas gasosas, sendo acompanhadas por sutis movimentos físicos.

Uma das finalidades do sono é repor os depósitos de adenosina trifosfato (ATP) em neurônios, músculos e outros tecidos com alto consumo energético. A privação prolongada do sono influencia negativamente o metabolismo,⁴ a saúde física e emocional⁵ e o comportamento neurocognitivo pela falta de reservas de ATP, principalmente no córtex e no prosencéfalo basal.⁶

No sistema nervoso central (SNC), o aumento da atividade neuronal aumenta o consumo de ATP, levando a um aumento das concentrações extracelulares de adenosina que, no papel de neurotransmissor, controla o metabolismo energético das células e atua como regulador homeostático do sono e como elo entre os mecanismos humorais e neurais da regulação vigília-sono.⁷ Derivada da lise do ATP, ADP, AMP, a concentração extracelular de adenosina aumenta durante a vigília, quando o estoque de ATP está baixo, causando sonolência, e diminui durante o período de sono. Por isso, a adenosina é considerada um “neurotransmissor retaliatório”.⁸

O sono humano normal é composto por dois estados distintos,⁹ caracterizados por diferentes parâmetros fisiológicos: sono REM (*Rapid Eye Movement*), que se distingue pela presença de ondas dessincronizadas no eletroencefalograma (EEG), pelos movimentos rápidos dos olhos, pela redução acentuada ou perda completa do tônus muscular e pela presença de sonhos; e sono NREM (*Non Rapid Eye Movement*), que está associado à presença

de ondas corticais sincronizadas, à atividade psicológica mínima no encefalograma, à redução do tônus muscular.¹⁰ Ele ocupa a menor parte do tempo, sendo subdividido em três ou quatro estágios, desde o mais superficial até o mais profundo: estágios N1, N2, N3, e N4.^{11, 12} Recentemente, os estágios N3 e N4 foram unificados ao N3,⁹ uma vez que as diferenças entre os dois se mostraram sem importância fisiológica qualitativa.

O hipnograma abaixo (Figura 1) mostra a distribuição dos estágios do sono em humanos adultos, representando as medidas da quantidade do sono: duração do sono (h por dia), percentagem do sono NREM e REM, e percentagem dos estágios NREM (N1-3); bem como as medidas da qualidade do sono: latência para iniciar o sono, latência para iniciar o sono REM e SWA em sono NREM.

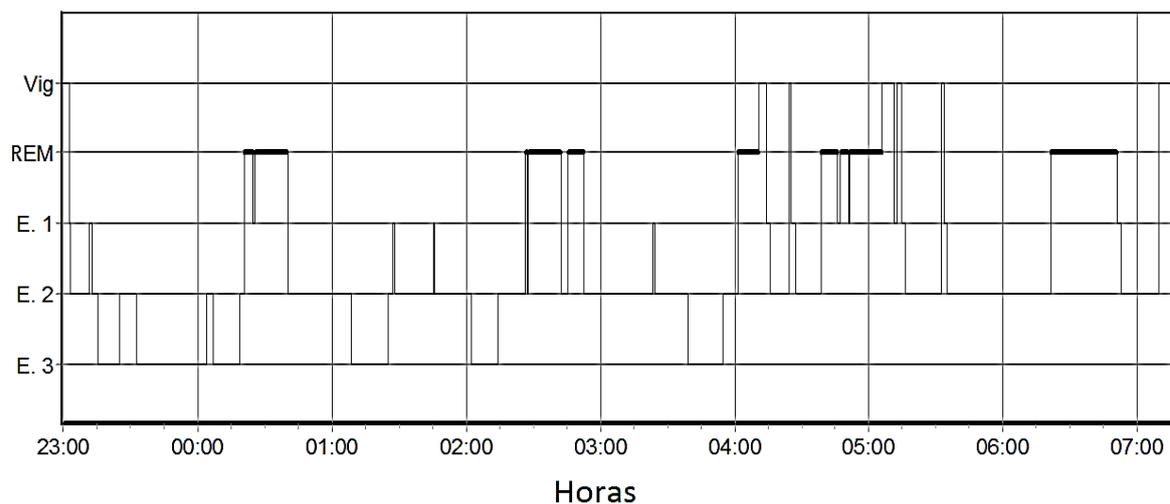


Figura 1 – Hipnograma. Mostra a duração dos estágios e a arquitetura do sono em adulto de 28 anos de idade. O horário padrão para a avaliação do sono noturno é entre as 23 e 7 horas.

Os estágios do sono em humanos estão representados na Figura 2, descritos como:

- Estágio N1: ocorre a transição da vigília para o sono, em que a consciência ainda é parcialmente conservada.

- Estágio N2: há a alternância cíclica entre as ondas excitatórias (complexos K) e inibitórias (fusos do sono). Tem duração de aproximadamente metade do tempo do sono.
- Estágio N3: ocorre um aumento progressivo de ondas lentas ou delta, com atividade superior a 20% do EEG, conforme o sono avança para o estágio N4.
- Estágio N4: é o estágio mais profundo do sono, com mais de 50% de ondas delta.

Um ciclo de sono inclui os três estágios do sono NREM, seguido do REM, e dura de 90 a 110 minutos. Os ciclos se repetem de quatro a cinco vezes por noite.

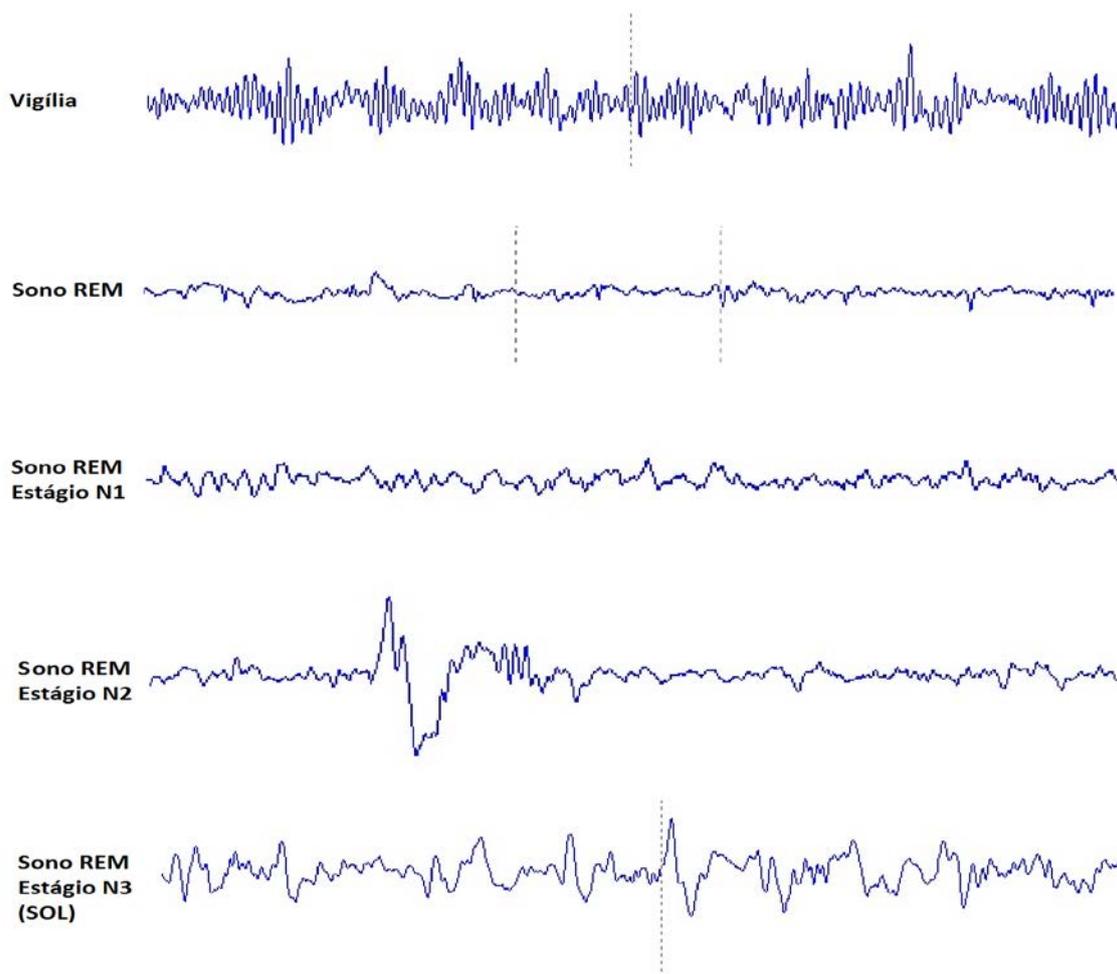


Figura 2 – Eletroencefalograma nos diferentes estágios do sono. O painel mostra traçados de eletroencefalograma (EEG) representativo na vigília, no sono sem movimento

rápido dos olhos (NREM) e no sono com movimento rápido dos olhos (REM). Na vigília "ativada", o EEG é dominado por baixa tensão, atividade rápida no beta (> 13 Hz) e variações no alfa (8-13 Hz). Sono NREM compreende uma fase de transição 1 (N1) e se refere à transição de ondas alfa com uma frequência de 8-13 Hz (comum no estado de vigília) para ondas teta, com uma frequência de 4-7 Hz. Essa fase é muitas vezes referida como sonolência ou sono sonolento, seguida pelo estágio 2 (N2), quando a atividade alfa desaparece, e em seguida, o sono de ondas lentas ou N3 (SOL), que é quando o EEG mostra ondas lentas proeminentes. Quanto maior o número de ondas lentas, mais profundo o sono NREM, ou seja, mais difícil é para acordar. Fusos do sono são oscilações finais, o encerramento com origem do tálamo e com frequência dentro da banda sigma (12-16 Hz); ondas lentas são de origem cortical e têm frequências dentro da banda delta, também chamada de atividade de ondas lentas (SWA, $<4,5$ Hz).

Estado da vida altamente complexo, o sono é organizado por diversos sistemas fisiológicos, como a reposição de energia. A qualidade do sono, assim como as consequências da fragmentação do sono, têm grande relevância sobre o funcionamento diurno e a qualidade de vida, impactando na saúde e em condições mórbidas. Obter uma visão clara das características normais do sono embasa e sustenta o entendimento e a interpretação de achados clínicos importantes que remetem a alterações da fisiologia do sono.

1.1.1 MEDINDO O SONO

Usa-se a polissonografia para definir os diferentes estágios do sono e para o diagnóstico de vários tipos de distúrbios do sono, incluindo narcolepsia, síndrome das pernas inquietas, distúrbio de comportamento do sono REM, parassonias e apneia do sono.¹³ Esse exame é considerado o padrão-áureo para diagnóstico. Um sistema para registro de PSG é instalado usualmente em um laboratório do sono e inclui a avaliação de no mínimo: (a) três canais de eletroencefalograma (EEG); (b) eletro-oculograma (EOG), que capta movimentos oculares; (c) eletromiograma (EMG), que representa o tono muscular; (d) movimento toracoabdominal; (e) fluxo aéreo oronasal; (f) saturação de oxigênio (SpO₂).¹⁴

O PSG consiste na monitorização em tempo real do sono do paciente durante uma noite inteira, em torno das 23 horas até às 7 horas. O monitoramento preciso do sono se dá

através do registro da atividade cortical do eletroencefalograma, bem como através do registro dos movimentos oculares, do tônus muscular e da atividade cardiorrespiratória.¹⁵ São utilizadas, ainda, outras propriedades, como os aspectos cardiorrespiratórios mostrados pelo eletrocardiograma, o fluxo aéreo, o esforço toracoabdominal e a oximetria, que, juntas às propriedades do PSG, demonstram o desempenho respiratório e quantificam o número de apneias e hipopneias durante o sono.

As características do sono podem ser avaliadas pelo tempo total em que se passa no leito, pela duração total do sono, pela eficiência do sono, pela latência aos sonos REM e NREM, pela alternância de estágios e pela quantidade de movimentos corporais.

2.1.2 TRANSTORNOS DO SONO

Face às numerosas interações existentes entre os sistemas de sono-vigília, a probabilidade de ocorrência de transtornos é alta. Santos-Silva et al (2010) encontraram, em um estudo feito na cidade de São Paulo até 99% de queixas por algum transtorno do sono,¹⁶ que pode ser vistos na Tabela 1. A população geral relata inconveniências durante o sono, desde câibras noturnas até bruxismo, ronco, pesadelos, passando por insônia e apneia do sono.

Tabela 1 - Frequências ponderadas (%) e frequências relativas de gênero de queixas de sono encontradas nas pesquisas realizadas em 1987, 1995, e 2007, na cidade São Paulo. Adaptada da referência 16.						
	1987	1987 (♂:♀)	1995	1995 (♂:♀)	2007	2007 (♂:♀)
Ronco	21,5 (19,1– 24,2)	1:0,5	19,0 (16,7– 21,6)	1:0,5	41,7 (38,6– 44,8)	1:0,6
Pesadelos	11,0 (9,2–	1:1,3	8,5 (6,9–	1:1,7	24,3	1:1,7

	13,1)		10,4)		(21,8– 27,4)	
Bruxismo	3,2 (2,3– 4,5)	1:1,5	3,8 (2,8– 5,2)	1:0,9	9,3 (7,7– 11,3)	1:1,3
Cãibras nas pernas	2,6 (1,8– 3,8)	1:1,8	3,4 (1,8– 5,0)	1:1,7	5,6 (4,5– 6,9)	1:1,2
Sonambulismo	0,8 (0,4– 1,6)	1:1,3	0,9 (0,4– 1,7)	1:0,9	2,8 (1,8– 4,0)	1:0,9
Paralisia do sono	1,8 (1,1– 2,8)	1:1,2	1,8 (0,8– 2,8)	1:1,5	7,6 (6,0– 9,5)	1:1,4
Sonolência diurna	4,5 (3,4– 6,0)	1:2,4	3,8 (2,8– 5,2)	1:1,3	8,6 (7,1– 10,5)	1:1,4

As mais graves implicações do sono perturbado, e as mais facilmente identificáveis, são as apneias e as hipopneias (AH) do sono, enquadradas nos transtornos respiratórios do sono (TRS). Os distúrbios respiratórios do sono¹⁷ são eventos momentâneos ou cíclicos de paradas da ventilação (apneias) ou de reduções sustentadas na amplitude ventilatória (hipopneias), capazes de causarem hipoxemia arterial significativa e hipercapnia.

A apneia (Figura 3, item B) é caracterizada pela cessação completa ou quase completa do fluxo de ar. Durante a apneia, com no mínimo 10 segundos de duração no adulto e 5 na criança, a saturação de oxigênio cai até que ocorra o despertar que irá encerrar o evento, podendo atingir, por alguns segundos, valores que, se fossem sustentados, seriam incompatíveis com a vida. Ao despertar, porém, reverte-se completamente a queda de saturação de oxigênio, causando fenômeno similar ao de isquemia-reperusão.

Hipopneia (Figura 3, item C) é definida como uma redução na amplitude da corrente de ar de pelo menos 50%, com uma duração de pelo menos 10 segundos, seguido por um decréscimo na SpO₂ a 4%, ou sinais de excitação fisiológica.¹⁸ A apneia e a hipopneia se diferem quanto ao grau de obstrução da faringe, entretanto, apresentam fisiopatologia e impactos clínicos semelhantes.

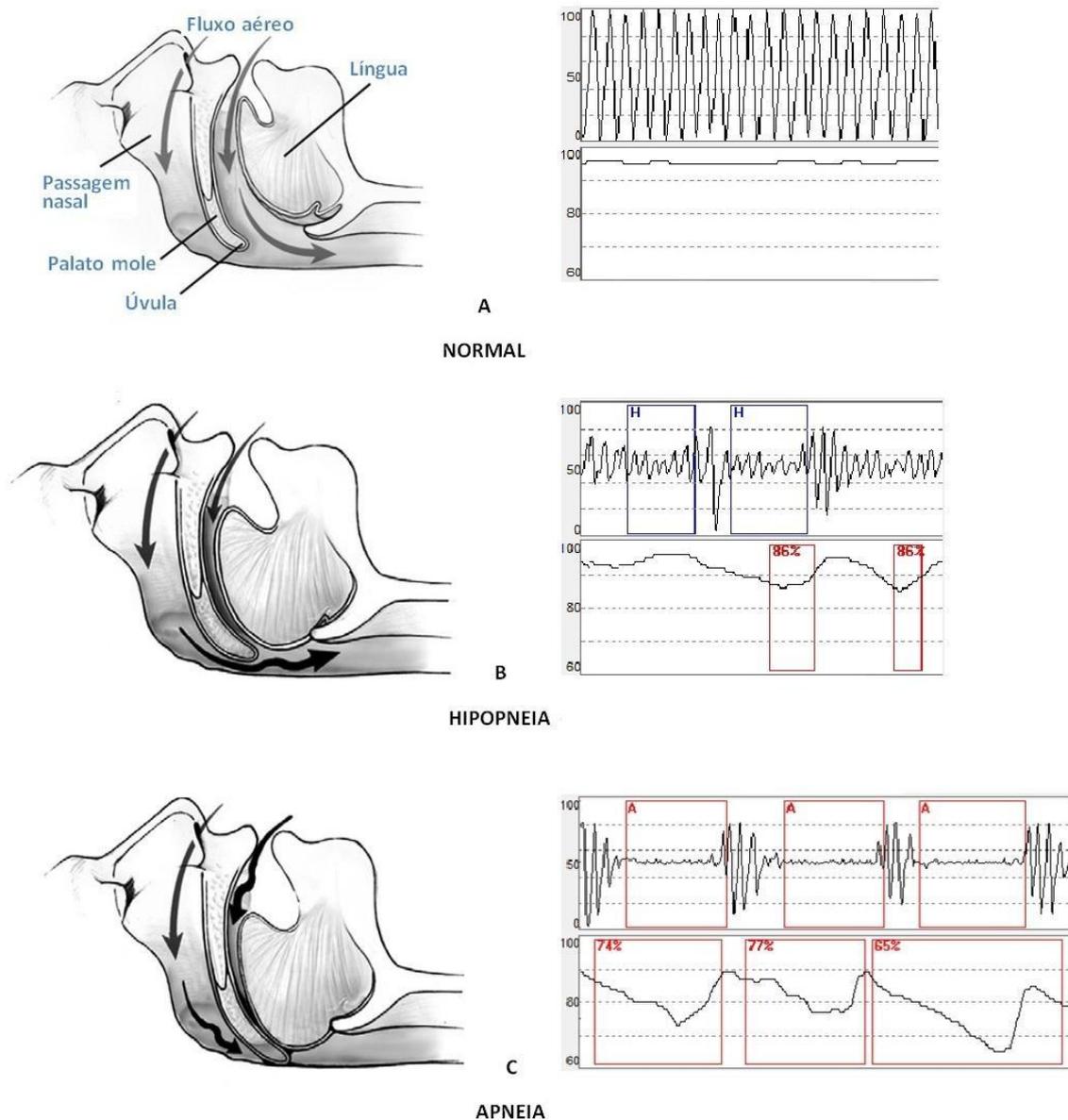


Figura 3 – Fluxo oronasal. Fluxo normal (A). Obstrução parcial e completa da via aérea superior durante o sono, resultando em hipopneia (B) e apneia (C), respectivamente. Adaptação da referência 28.

Exclusivas ao sono, as apneias e as hipopneias podem surgir por: 1) comprometimento e até mesmo obstrução completa do fluxo aéreo na via aérea superior (apneia obstrutiva do sono ou AOS); 2) por acentuada redução ou parada da atividade dos neurônios respiratórios do tronco cerebral (apneia central do sono ou ACS); 3) por combinação de mecanismos centrais e obstrutivos (eventos mistos).^{19, 20}

Na apneia obstrutiva do sono, os mecanismos que mantêm o tônus das vias aéreas superiores ficam disfuncionais, resultando em estreitamento ou colapso da via aérea,^{21, 22} apesar do esforço respiratório.²³ A colapsidade da faringe pode ser causada por anormalidades anatômicas ou por disfunção dos músculos que controlam a via aérea superior, obstruindo-a.²⁴ Repetidas obstruções causam, portanto, hipóxia intermitente (HI), aumento dos esforços inspiratórios e interrupção do sono – sintomas que têm sido amplamente associados com várias consequências neurológicas^{25, 26} e cardiovasculares.^{27, 28} A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é uma forma tratável de distúrbios respiratórios, em que a via aérea superior fecha repetidamente durante o sono.²⁹ A SAOS causa diversos sintomas, entre eles fadiga, sonolência, depressão e insônia,^{21, 30} em que o sono excessivo diurno (SED) é o principal sintoma.³¹

Apneia central do sono é caracterizada pela perda intermitente da capacidade ventilatória, resultando em apneia seguida de períodos de compensação por hiperventilação, em que não ocorre obstrução da via aérea. A cessação da ventilação ocorre devido à ausência de impulsos nervosos que regulam a respiração e acontece principalmente em pacientes com insuficiência cardíaca.³² Já na apneia do sono mista, existe uma transição de central para características obstrutivas durante as apneias.²⁰

A Figura 4 mostra o traçado polissonográfico na apneia obstrutiva do sono, na apneia central e na apneia o sono mista.

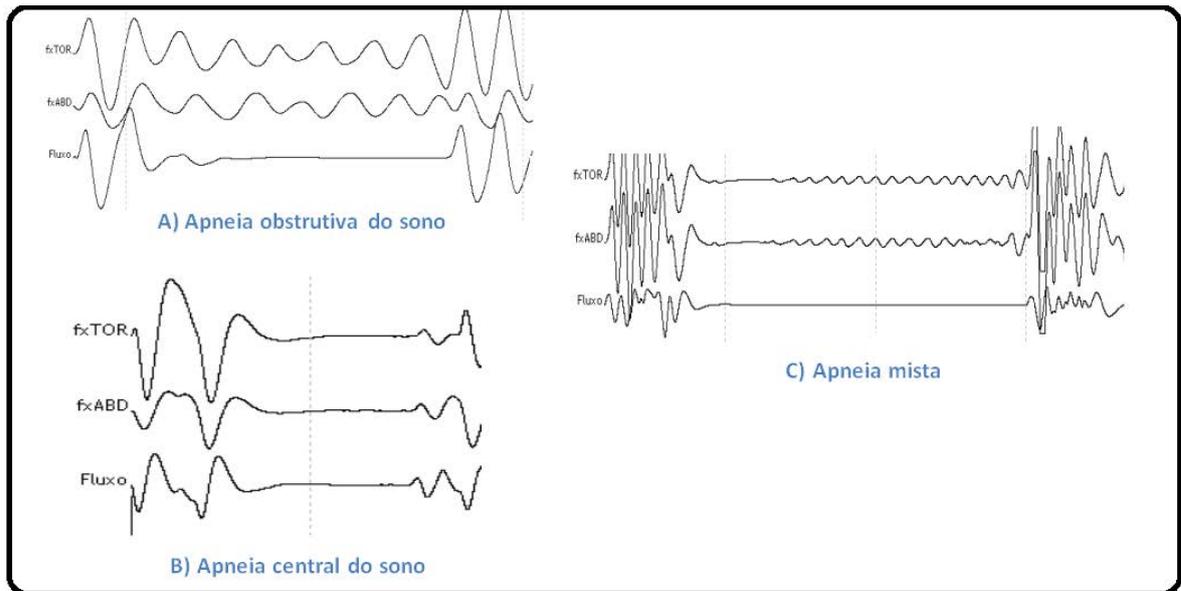


Figura 4 – Ilustração do esforço ventilatório toracoabdominal e ausência de fluxo aéreo no traçado de polissonografia.

Síndrome é um conjunto de sinais e sintomas. O diagnóstico de síndrome das apneias e hipopneias do sono (SAHOS) exige a ocorrência de cinco ou mais apneias ou hipopneias por hora de sono associadas a sintomas de sono perturbado, como sonolência excessiva diurna, insônia, cansaço e sono agitado.³³ Se mais da metade das apneias forem centrais, a síndrome é chamada de apneia central; se a maioria das apneias forem obstrutivas, é chamada síndrome da apneia obstrutiva.³⁴ A figura 5 demonstra os critérios diagnósticos para a síndrome das apneias e hipopneias do sono (SAHOS), conforme a *American Academy*.

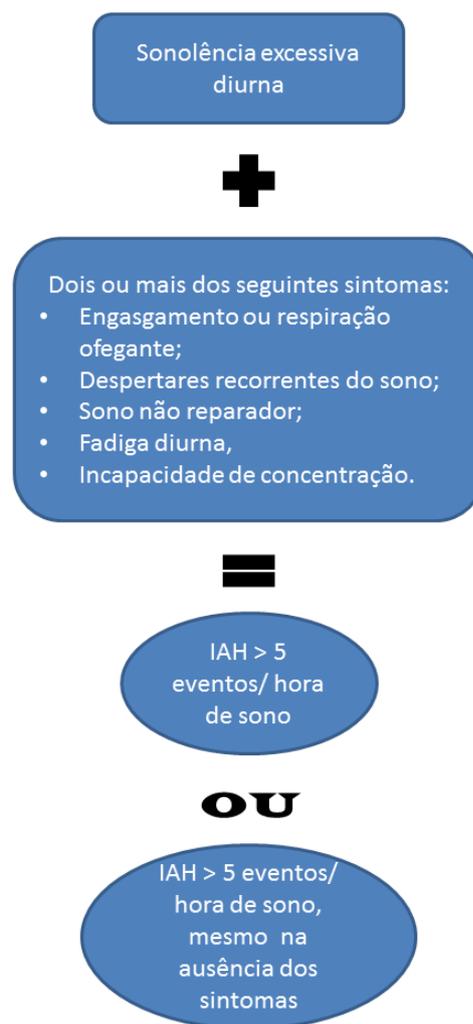


Figura 5 – Critérios para diagnóstico da SAHOS.

Para avaliar a qualidade do sono e a gravidade das apneias do sono, usa-se o índice de apneia e hipopneia (IAH), determinado ao se dividir o número total de episódios de apneias e hipopneias pelo total de horas de sono. Segundo a American Academy,³⁵ o IAH é tipicamente categorizado como:

- Normal: $IAH \leq 5$ AH/hora
- Leve: $IAH > 5$ e < 15 AH/hora
- Moderado: $IAH > 15$ e < 30 AH/hora
- Severo: $IAH \geq 30$ AH/hora

Além dos episódios de apneias e hipopneias, o sono também pode ser interrompido por despertares de esforço respiratório-relacionados (em inglês, respiratory effort-related arousals, RERAs), eventos que ocorrem devido ao aumento da resistência da via aérea superior. Nos RERAs, ocorre o despertar do indivíduo antes que ocorra o contato entre as paredes da faringe, o que leva ao ronco e à parada do fluxo aéreo, e, no caso de não haver interrupção do fluxo, a saturação de oxigênio permanece inalterada. Breves, os despertares duram de 3 a 15 segundos e causam sono não reparador, sonolência diurna e fadiga. A fisiopatologia dos RERAs é similar a das apneias obstrutivas do sono, o que faz com que despertares esforço respiratório-relacionados façam parte da contagem dos eventos obstrutivos e sejam incluídos entre os eventos anormais que se somam aos critérios de diagnóstico da apneia do sono.

Quando se incluem RERAs ao IAH, este passa a se chamar índice de distúrbio respiratório (IDR). Em achados de polissonografias, pacientes com IDR maior que 5 AH/hora são considerados portadores de apneia do sono.

Inadequações ventilatórias acompanhadas de hipoxemia intermitente muitas vezes levam a despertares transitórios do sono e à fragmentação do sono durante toda a noite, causando respostas compensatórias do sistema nervoso autônomo.

Outros achados, como lesões cardiovasculares, estão correlacionados a transtornos do sono, assim como inflamação sistêmica, estresse oxidativo e disfunção endotelial. O exemplo mais crítico é a apneia obstrutiva do sono, mas a ativação simpática, o estresse oxidativo e a inflamação sistêmica são os principais mecanismos intermediários associados ao sono e à apneia da hipóxia intermitente.

2.1.3 PREVALÊNCIA

O aumento de conhecimento sobre a SAHOS demonstrou sua gravidade como problema de saúde pública por ser prevalente e impor relevante morbidade cardiovascular e neurocognitiva em todas as faixas etárias.

Em uma coorte da população de 1502 israelenses, 78 trabalhadores industriais saudáveis foram questionados sobre hábitos e transtornos do sono, bem como submetidos à

polissonografia por, pelo menos, uma noite inteira. Obtiveram-se 1,2% de prevalência de apneia e identificou-se associação significativa entre SED e apneia do sono.³⁶ Um estudo de base populacional iniciado em 1988 mostrou combinação de sonolência com mais de 5 AH por hora foram observadas em 2% das mulheres e em 4% dos homens com idades entre 30 e 60 anos que preenchiam os critérios mínimos para o diagnóstico da SAOS.³⁷

No Brasil, o primeiro levantamento epidemiológico da população com apneia do sono foi feito por Tufik et al,³⁸ que encontrou a prevalência de SAOS em 32,8% na população adulta da cidade de São Paulo, ou seja, a maior prevalência de SAOS já observada entre todos estudos epidemiológicos. A figura 6 mostra a prevalência da Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono por gênero em uma projeção demográfica para os habitantes da cidade de São Paulo em 2007. Essas projeções foram derivadas do censo feito em São Paulo no ano de 2000.

Extrapolando os dados de São Paulo para o restante do Brasil, mais de 50 milhões de brasileiros estão expostos todas as noites a episódios repetidos de hipóxia. Com a crescente epidemia de obesidade, a prevalência de apneias obstrutivas do sono aumenta de forma alarmante, tornando a SAOS mais frequente do que asma e diabetes,³⁹ e fazendo com que a necessidade de se entender as consequências desses fatos seja evidente.

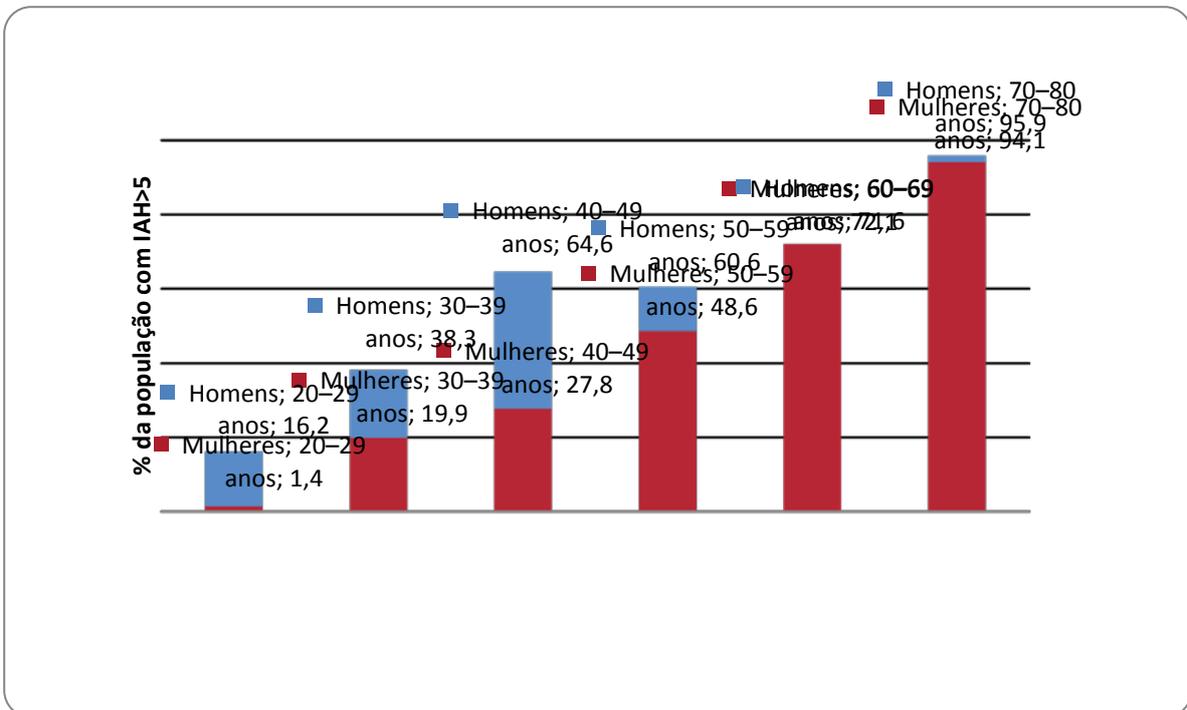


Figura 6 – Prevalência da Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono em homens e mulheres. Estimativa de prevalência ponderada (%) da Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono em homens e mulheres em uma amostra probabilística (n= 1042) de habitantes de São Paulo. Adaptada da referência 38.

2.1.4 PATOGÊNESE DA SAOS

A apneia do sono ocorre por causas anatômicas e funcionais. Como causas funcionais, ocorre o relaxamento em excesso da musculatura dilatadora da via aérea superior durante o sono, diminui o volume pulmonar de reserva expiratória, ocorrem perturbações da estabilidade do sistema de controle da ventilação e instabilidade do sono.^{19,22}

O início da apneia obstrutiva do sono é caracterizado pelo colapso que leva à asfíxia, causando o aumento do esforço respiratório e das oscilações de pressão intratorácica. O crescente esforço respiratório é detectado por mecanorreceptores da parede torácica (fusos e órgãos de Golgi), que levam à ativação dos músculos que reabrem a via aérea superior, culminando na interrupção do sono.⁴⁰

O maior músculo responsável por ser dilatador da via aérea superior (VAS) é o genioglosso, que compõe a maior parte do corpo da língua. Com sua atividade reduzida durante o sono, ele propicia o estreitamento da VAS, no entanto, sua função aumenta em resposta a elevações da resistência da VAS e da hipercapnia. Diversos componentes do sistema de controle da ventilação modulam este músculo, assim como a ativação/desativação dos centros de sono/vigília, dos neurônios geradores de padrão respiratório, dos quimiorreceptores e mecanorreceptores que informam sobre a eficiência da ventilação e do fluxo de ar na VAS.⁴¹

Como causa anatômica que leva à apneia obstrutiva do sono, a anatomia da faringe tem um importante papel, e, como pode ser visto na Figura 7, a região oral da faringe se divide em: nasofaringe, retropalatal, retroglossal e hipofaringe.

Em um estudo de caso controle feito por Schwab RJ et al (2003), foi demonstrado que a estrutura dos tecidos moles da via aérea superior, incluindo língua, paredes laterais da faringe, palato mole e camada de gordura no espaço perifaríngeo, foram significativamente maiores em pacientes apneicos comparados aos controles (Figura 7 B). Ajustando-se para

sexo, idade, etnia, tamanho craniofacial e quantidade de gordura ao redor da via aérea, esse resultado permaneceu o mesmo entre os grupos. Além disso, o aumento do volume destes tecidos ampliou significativamente o risco para AOS.⁴²

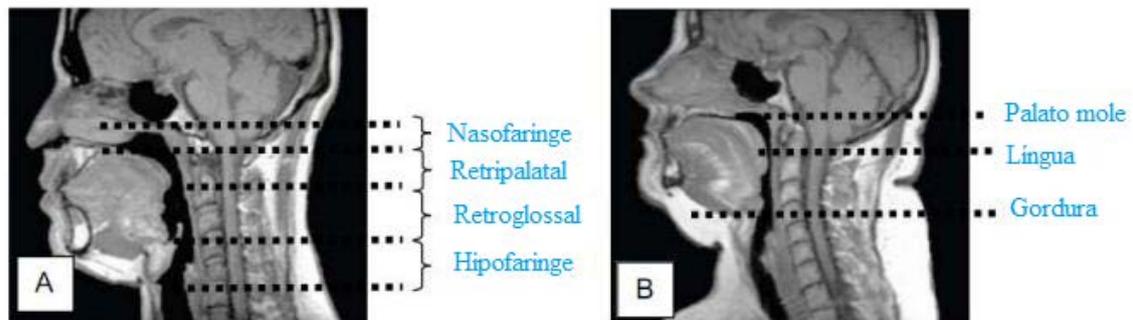


Figura 7 - Imagem sagital, analisada por ressonância magnética de indivíduo normal e com apneia obstrutiva do sono. A: indivíduo normal e destacada as regiões da VAS. B: indivíduo com apneia do sono grave com destaque para os tecidos moles. O indivíduo B apresenta as regiões retropalatal e retroglossal da VAS mais estreitas, assim como o palato mole, a língua e a gordura subcutânea são maiores. Adaptada referência 42.

Para Watanabe et al. (2002), anormalidades craniofaciais e obesidade podem contribuir paralelamente no aumento da colapsabilidade da via aérea superior na AOS. Em obesos apneicos, o fechamento da via aérea superior ocorre principalmente na velofaringe e quando acompanhado de recuo na mandíbula, o colapso ocorre na velofaringe e na orofaringe.⁴³

2.1.5 REPERCUSSÃO DAS APNEIAS DO SONO NO ORGANISMO

As principais consequências da SAOS se devem principalmente a dois fenômenos característicos da apneia do sono: o despertar e a hipóxia intermitente. O despertar causa aumento do tono simpático; enquanto a hipóxia intermitente causa liberação de radicais livres e estresse oxidativo, além de ativar os mecanismos neuronais, humorais, trombóticos, metabólicos e inflamatórios.

As apneias do sono causam lesão no sistema nervoso central por reações de oxidação e nitração ⁴⁴ e danos ao aparelho cardiovascular por aumento de incidência de hipertensão arterial sistêmica.^{45, 46} A hipertensão arterial pode ser a base para as demais consequências cardiovasculares das apneias e está comprovadamente relacionada à HI.^{47, 48} Modelos de HI em roedores foram capazes de provocar hipertensão arterial sistêmica, resistência à insulina e dislipidemia. Estudos em humanos demonstraram que pacientes obesos com SAHOS podem ter risco aumentado de desenvolver esteatohepatite não alcoólica e dano hepático crônico.⁴⁹ Já hipóxia durante 30 minutos causa dano sobre o glicocálice endotelial no coração.⁵⁰

As principais consequências da SAOS já confirmadas por artigos publicados em revistas de alto impacto podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Principais consequências da SAOS

Consequências	Periódico e Ano
Cardiovasculares	
Hipertensão	N Engl J Med. 2000 JAMA. 2000
AVC	N Engl J Med. 2005
Morte súbita	N Engl J Med. 2005 ⁵¹
Arritmia	Am J Respir Crit Care Med. 2006 ⁵²
Coronariopatia	Lancet. 2005 ⁵³
Aterosclerose	Chest. 2011 ⁵⁴
Metabólicas	
Diabete	Thorax. 2009 ⁵⁵ Am J Respir Crit Care Med.

Dislipidemia	Eur Respir J. 2006 ⁵⁷
	Sleep Breath. 2012 ⁵⁸
Síndrome metabólica	N Engl J Med.2011 ⁵⁹

Diferentes estudos (conforme a Tabela 2) demonstraram a correlação entre apneia do sono, inflamação, resistência à insulina e dislipidemia, bem como a contribuição dessas condições na aterosclerose e doença cardiovascular. Devido à importante associação a problemas cardiovasculares e metabólicos, a apneia do sono tem sido tratada, mais do que como anormalidade respiratória, como doença sistêmica. Mas, até o momento, a associação entre câncer, angiogênese, proliferação celular, e apneias do sono é pouco conhecida.

2.1.6 TRATAMENTO

Pressão positiva contínua das vias aéreas (em inglês, continuous positive airway pressure - CPAP) é o único tratamento que consegue eliminar as principais consequências das SAOS. O mecanismo faz com que o CPAP mantenha a pressão estável ao longo do ciclo respiratório – uma fonte de pressão de ar que gera fluxos levados às vias aéreas superiores através de uma máscara nasofacial (conforme Figura 8). O CPAP induz à permeabilidade das VAS durante a inspiração e expiração, fazendo com que diminuam as apneias, bem como eventos de dessaturação da oxihemoglobina.^{60, 61}

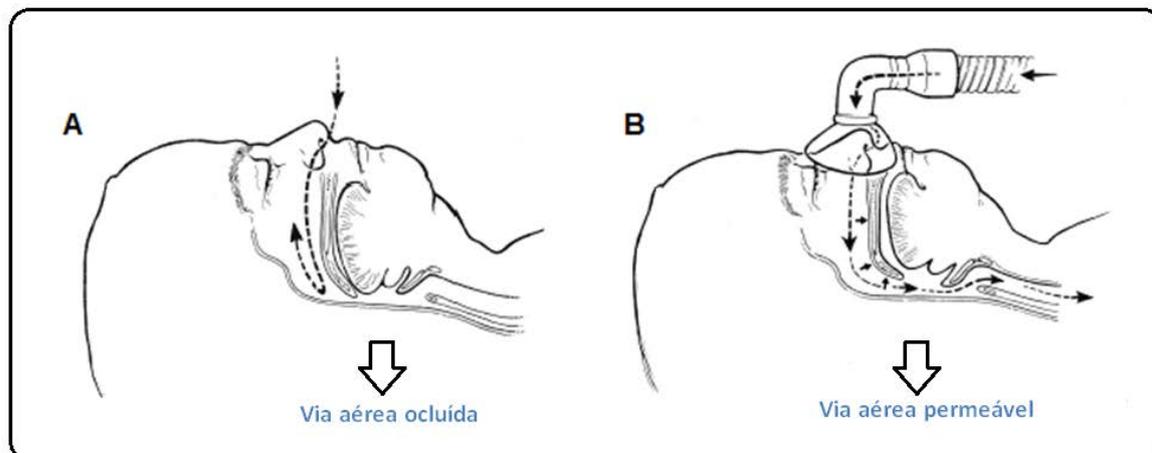


Figura 8 – CPAP. A) Apneia obstrutiva do sono (via aérea ocluída); B) A pressão de ar exercida pelo CPAP desobstrui a via aérea superior (via aérea permeável). Adaptada referência 62.

2.1.7 PAPEL DO FATOR 1- α INDUZIVEL POR HIPÓXIA

Mecanismos de adequação celular para condições de hipóxia são essenciais aos processos fisiológicos normais de desenvolvimento, como crescimento, angiogênese e metabolismo. Porém, em resposta à diminuição do suprimento de oxigênio (O_2), também estão envolvidas numerosas condições patofisiológicas, incluindo câncer, doenças inflamatórias e doença vascular.⁶²

Situações de hipóxia desencadeiam uma série de acontecimentos que levam à ativação de HIFs (fatores induzíveis por hipóxia),⁶³ que são fatores de transcrição formados por um dímero composto por uma subunidade α instável e uma subunidade β estável, também conhecido como translocador nuclear receptor aril hidrocarboneto (ARNT).⁶⁴

O HIF- α humano tem três isoformas: HIF-1 α , HIF-2 α , e HIF-3 α , sendo que o HIF-1 α desempenha um importante papel na homeostase do O_2 , principalmente na resposta à hipóxia aguda. Ele é conhecido por promover a expressão de numerosos genes associados a processos como eritropoese,⁶⁵ angiogênese, crescimento celular, diferenciação, sobrevivência, e apoptose.⁶⁶

Em normóxia, os níveis de HIF-1 α (fator-1- α induzível por hipóxia) são mantidos baixos em consequência da eficiente degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. A taxa de degradação do HIF-1 α depende da duração do stress hipóxico, e a degradação do HIF-1 α pode ser suprimida por: a) inibindo de forma geral a transcrição com actinomicina D, ou b) bloqueando especificamente a atividade transcricional do HIF-1-dependente. HIF-1 α é direcionado para o proteassoma através de um fator de HIF-1 α proteassoma alvo (HPTF), cuja expressão está diretamente sob controle do HIF-1, mediada pela atividade de transcrição.⁶⁷

A instabilidade do HIF-1 α em normóxia é principalmente devida à atividade de hidroxilases proil (DPSs), que utilizam oxigênio molecular como co-substrato para catalisar a hidroxilação de HIF-1 α .⁶⁸ Sob condições regulares de O₂, níveis HIF-1 α e HIF-2 α são hidroxilados em resíduos proil, e essa modificação cria uma interface com a proteína vonHippel-Lindau (pVHL), que recruta o complexo E3 (proteína ligase ubiquitina), que, por sua vez, catalisa a poli-ubiquitinação do HIF e subsequente degradação proteossômica. Esse processo é suprimido por hipóxia e quelação de ferro, o que permite a ativação transcricional.⁶⁹

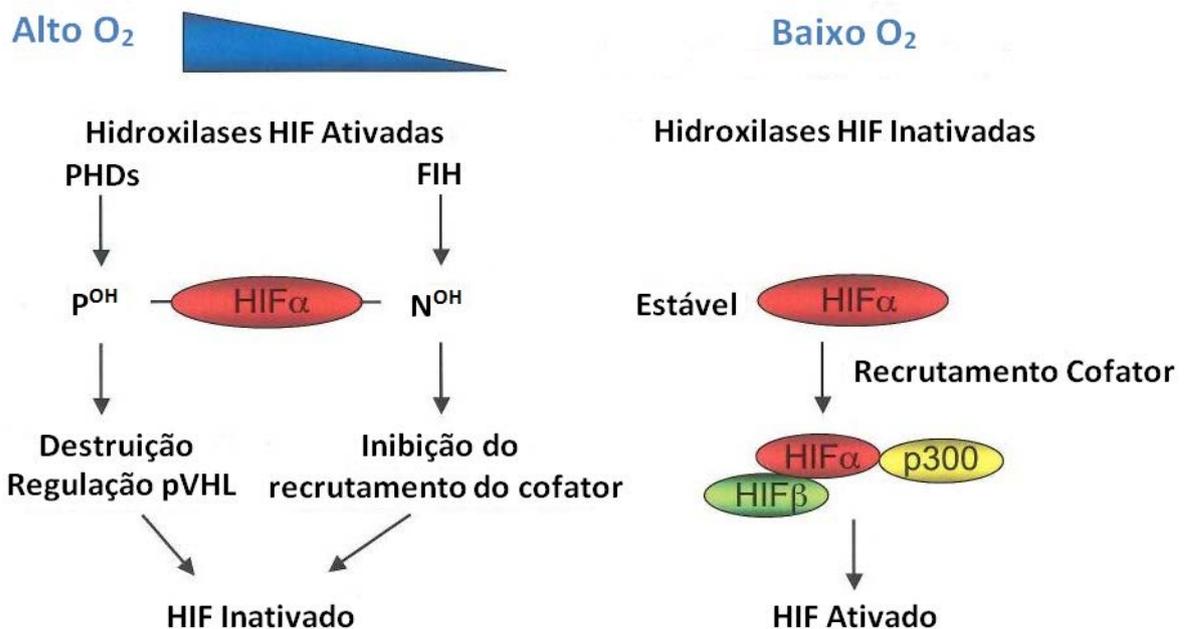


Figura 9 – Regulação das subunidades HIF- α pela disponibilidade de O₂ e outros metabólitos intracelulares. Em células supridas de oxigênio, as HIF proil-hidroxilases (DPSs) estão ativas, resultando na hidroxilação de resíduos de prolina em HIF- α e na sua degradação

direcionada através da via pVHL-proteassoma. A hidroxilação do "Fator de inibição do HIF" (FIH) de um resíduo de asparagina na extremidade C-terminal da subunidade HIF- α leva ao recrutamento de blocos P300 do cofator. Isto resulta na inativação da atividade da subunidade transcricional HIF- α . Todos esses processos são inibidos quando diminuem os níveis de O₂ ou quando as células apresentam níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de outros metabólitos, tais como succinato, e óxido nítrico (NO). Aqui, as subunidades HIF- α são estabilizadas, e elas recrutam coativadores como o P300 e genes HIF-alvo ativos. Adaptada referência 110.

Em resposta a hipóxia, a hidroxilação é inibida, o HIF-1 α rapidamente se acumula, dimeriza com HIF-1 β , liga-se ao DNA do núcleo na sequência de genes alvo de ligação 5'-RCGTG-3'purinas (A ou G), recruta co-ativadores e ativa a transcrição.⁷⁰ A rápida acumulação de HIF-1 α promove uma resposta transcricional adequada para a adaptação e sobrevivência,⁷¹ relaxando sua degradação ubiquitina-proteassoma-dependente

Durante a proteólise, as ligações peptídicas que conectam os aminoácidos são hidrolisadas por enzimas denominadas proteases, enquanto os aminoácidos livres são libertados, liberando a energia investida na síntese da ligação peptídica. Distintos mecanismos proteolíticos servem para diferentes necessidades fisiológicas e permitem que o organismo se acomode às mudanças das condições ambientais e fisiopatológicos.⁷²

A degradação de uma proteína através da via da ubiquitina-proteassoma envolve dois passos discretos e sucessivos: (1) marcação do substrato por ligação covalente de moléculas múltiplas de ubiquitina; e (2) degradação da proteína marcada pelo complexo de proteassoma 26S, com liberação de ubiquitina livre e reutilizável. Esse último processo é mediado por enzimas de reciclagem de ubiquitina. A conjugação da ubiquitina, polipeptídeo de 76-resíduo altamente conservado evolutivamente, para o produto de proteína de substrato envolve uma cascata de três vias.

Interações celulares com o estroma e com outras células fornecem sinais que interrompem condições homeostáticas de sobrevivência, divisão ou morte, e entrada ou saída de um estado de repouso celular. Em conjunto, tais interações são essenciais para a manutenção da homeostase dos tecidos, cuja oxigenação é um componente importante do microambiente tecidual, que pode alterar o comportamento de uma célula através da

regulação direta de genes envolvidos na sobrevivência celular, apoptose, metabolismo da glicose, e angiogênese. A perda da homeostase tecidual devido, por exemplo, à ativação de oncogenes leva a perturbações dos sinais e, eventualmente, à transformação celular e desenvolvimento de tumor.⁷³

HIFs são comumente superexpressos em tumores, como consequência da inativação do gene supressor de tumor, que desempenha um papel central no desenvolvimento tumoral, como HIF-alvos envolvidos na angiogênese, glicólise, crescimento celular, anti-apoptose, metástase.⁷⁴

O sistema de HIFs pode ser um alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos tumorais, cujo objetivo é a inibição da acumulação e/ou da atividade de qualquer um dos HIFs.⁷⁰

2.2 NEOPLASIAS

O câncer é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 12,7 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de mortes por câncer possam ter ocorrido nos Estados Unidos em 2008.^{75, 76} Em 2020, a população mundial aumentará para 7,5 bilhões; deste número, aproximadamente 15 milhões de novos casos de câncer serão diagnosticados, e 12 milhões de pacientes com câncer irão a óbito.⁷⁷

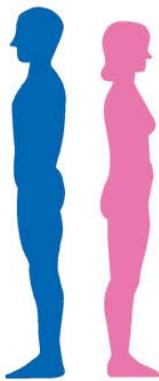
Novos Casos Estimados*							
			Homens	Mulheres			
Próstata	241,740	29%		Mama	226,870	29%	
Pulmão e Brônquios	116,470	14%		Pulmão e Brônquios	109,690	14%	
Cólon e Reto	73,420	9%		Cólon e Reto	70,040	9%	
Bexiga	55,600	7%		Corpo Uterino	47,130	6%	
Melanoma de Pele	44,250	5%		Tiróide	43,210	5%	
Rim e Região Pélvica	40,250	5%		Melanoma de Pele	32,000	4%	
Linfoma não-Hodgkin	38,160	4%		Linfoma não-Hodgkin	31,970	4%	
Cavidade Oral e Faringe	28,540	3%		Rim e Região Pélvica	24,520	3%	
Leucemia	26,830	3%		Ovário	22,280	3%	
Pâncreas	22,090	3%		Pâncreas	21,830	3%	
Todos Locais	848,170	100%		Todos Locais	790,740	100%	

Figura 10 – Estimativa de câncer nos EUA. Dez principais tipos novos casos estimados de câncer por sexo nos Estados Unidos, 2012. Adaptada referência 76.

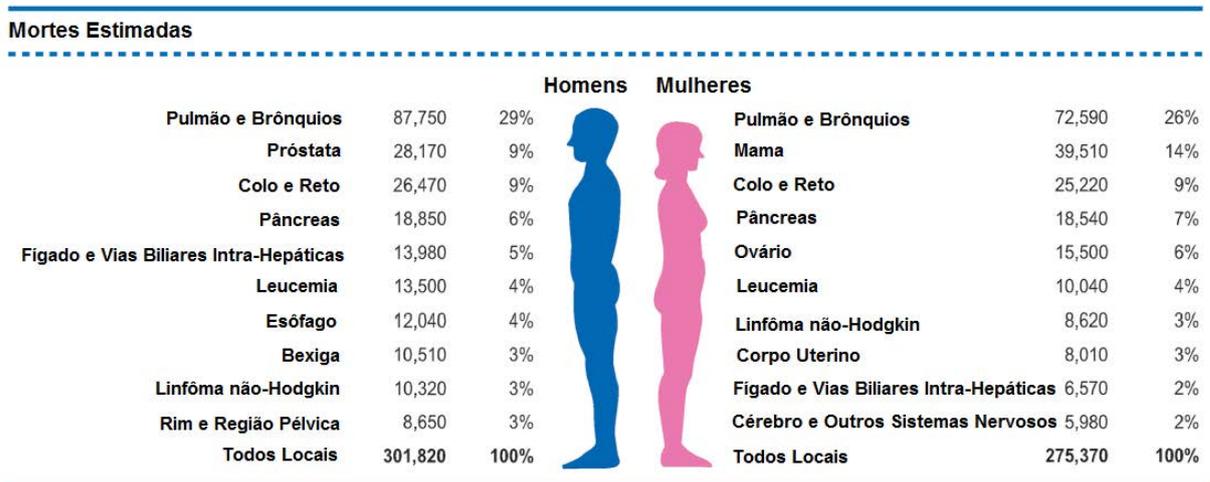


Figura 11 – Estimativa de mortes por câncer nos EUA. Dez principais mortes estimadas por tipos de câncer por sexo nos Estados Unidos, 2012. Adaptada referência 76.

O aumento das taxas globais de câncer deve-se, em grande parte, ao envelhecimento e ao crescimento da população mundial, bem, como a uma crescente adoção de comportamentos que levam ao câncer. Apenas 5-10% de todos os casos de neoplasias podem ser atribuídos a defeitos genéticos,⁷⁸ conforme a Figura 13.

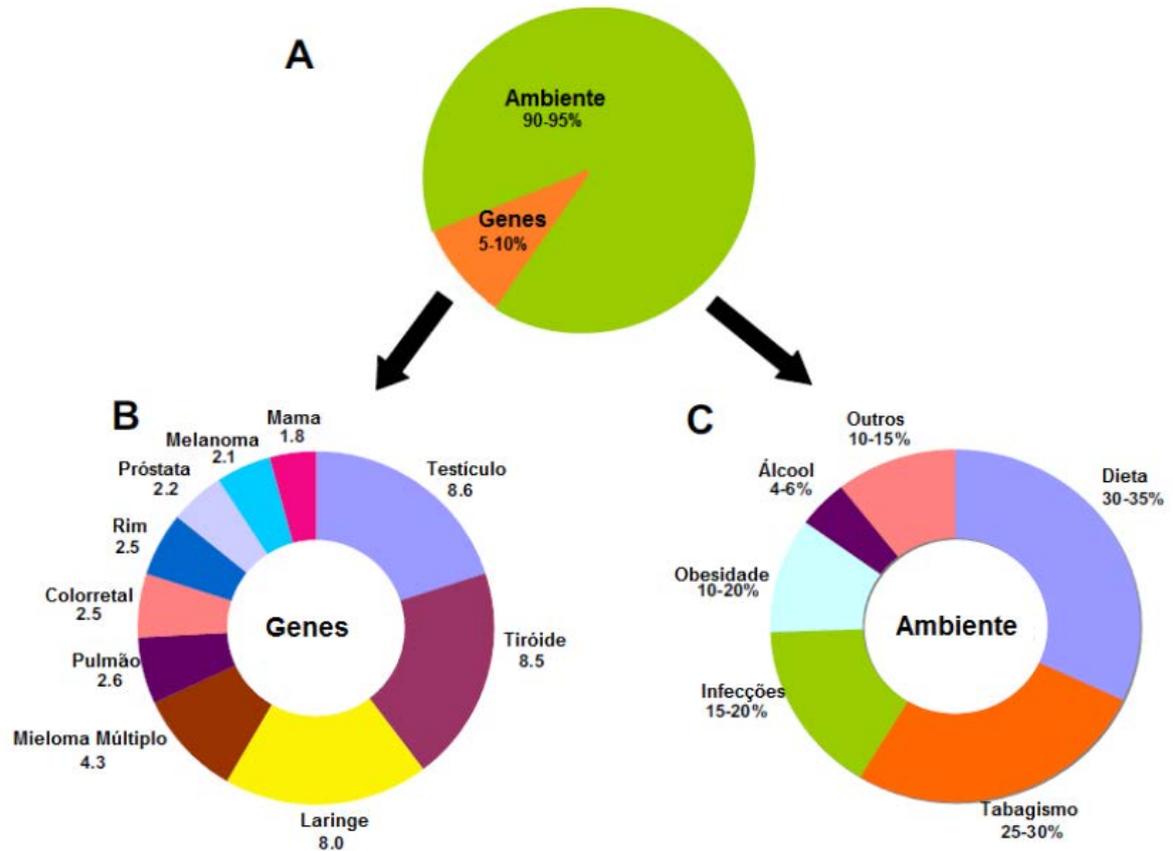


Figura 12 - O papel dos genes e do ambiente no desenvolvimento do câncer. A) Percentagem de contribuição dos fatores genéticos e ambientais no câncer, que é de 5-10% e 90-95%, respectivamente. B) Relação de risco familiar para os cânceres selecionados. Os números representam relações de risco familiar, definido como o risco de um determinado tipo de relação de um indivíduo afetado dividido pela prevalência na população. Os dados mostrados aqui são de um estudo realizado em Utah para determinar a frequência de câncer em parentes de primeiro grau (pais + irmãos + filhos). As razões de risco familiar foram avaliadas como a razão entre o número observado de casos de câncer entre os parentes em primeiro grau, dividido pelo número derivado esperado dos parentes do controle, com base no tempo de nascimento (coorte) dos casos familiares. Em essência, isso oferece uma taxa de risco ajustada por idade para os casos de parentes de primeiro grau em comparação com a população em geral. C) Percentual de contribuição de cada fator ambiental. As percentagens representadas aqui indicam a fração atribuível de mortes por câncer devido ao fator de risco específico ambiental. Adaptada referência 79.

2.2.1 OBESIDADE COMO FATOR DE RISCO PARA NEOPLASIAS

A obesidade, um dos mais graves problemas de saúde pública em crescimento em todo o mundo, está associada à síndrome metabólica, a diabetes, à doença cardiovascular, à hipertensão, e a outras doenças crônicas, e recentemente, ao risco aumentado de neoplasias.

Mecanismos biológicos envolvidos na relação entre obesidade e câncer não são bem compreendidos, e incluem modulação do balanço energético e restrição calórica, fatores de crescimento, vias de sinalização e processos inflamatórios.⁷⁹

O tecido adiposo é um órgão endócrino que produz e secreta hormônios polipeptídicos, as adipocinas, entre as quais a leptina e adiponectina são as mais abundantes e envolvidas no desenvolvimento neoplásico.⁸⁰ A leptina é positivamente correlacionada a estoques do tecido adiposo e estado nutricional, sendo importante no equilíbrio energético e no controle do apetite, bem como induzindo a progressão tumoral através da ativação das vias PI3K, MAPK, e STAT3.⁸¹ A adiponectina é secretada principalmente a partir de tecido adiposo visceral e, ao contrário da leptina, está inversamente relacionada à adiposidade, à inflamação e à hiperinsulinemia. Além disso, a adiponectina pode exercer efeitos antitumorais através da diminuição de insulina, e através do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e sinalização mTOR por meio da ativação de proteína quinase AMP5'-ativada (AMPK). Ela exerce ações anti-inflamatórias via inibição do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) de células B ativadas.⁸²

A adiposidade corporal está associada a níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a prostaglandina E2, TNF- α , IL-2, IL-8, IL-10 e a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP) -1. A ativação de NF- κ B é um complexo mecanismo, em que a inflamação pode estimular o desenvolvimento tumoral, conforme a Figura 14.⁸³

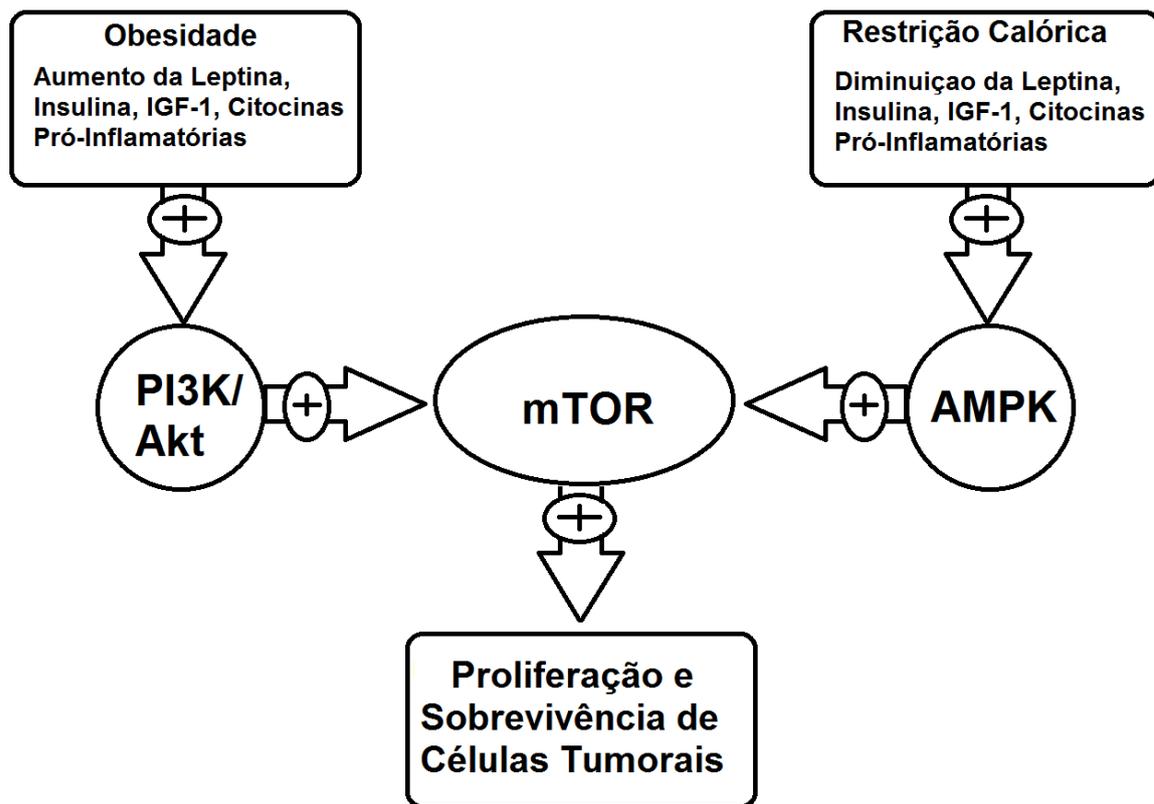


Figura 13 - Metabolismo energético. A obesidade aumenta os níveis circulantes de leptina, IGF-1 disponíveis e citocinas pró-inflamatórias, levando ao aumento da sinalização através da cascata PI3K/Akt. Esses sinais convergem em mTOR, promovendo a proliferação de células e a inibição da apoptose. Por outro lado, a restrição calórica melhora a sinalização através da atividade AMPK, suprimindo mTOR e promovendo a morte da célula tumoral. Adaptada referência 80.

Os macrófagos, ativados na obesidade, infiltram-se nos tumores, e amplificam o microambiente inflamatório do tumor através da produção de citocinas, prostaglandinas e fatores angiogênicos.⁸⁴ Assim, múltiplos hormônios, fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores associados às perturbações metabólicas da obesidade sinalizam a inflamação para os macrófagos, os adipócitos, as células endoteliais, as células epiteliais e outros componentes do microambiente. Como mostrado na Figura 15, tais fatores associados à obesidade contribuem para os processos relacionados ao câncer.^{85, 86, 87}

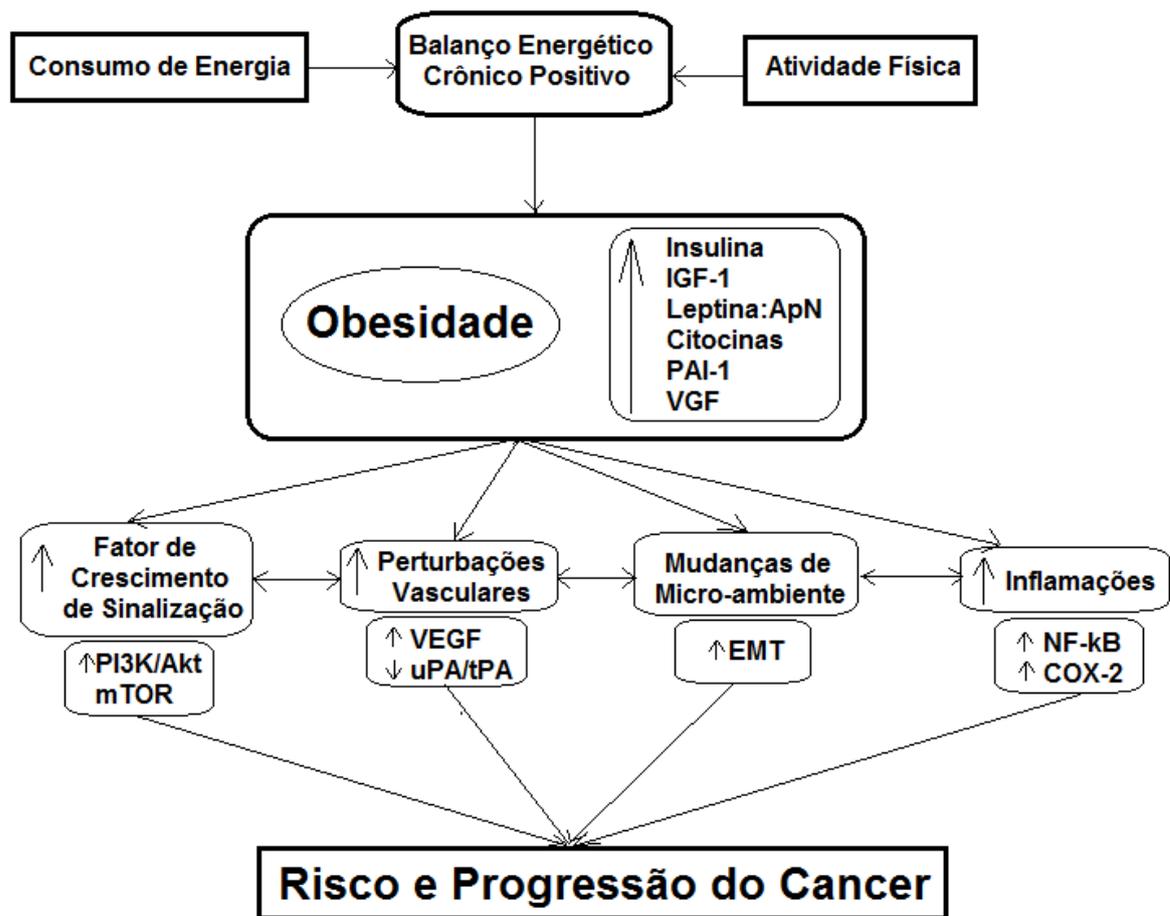


Figura 14 – Obesidade, balanço energético e câncer: uma visão mecanicista. A seta que precede o texto indica um efeito direcional (por exemplo, atividade ou concentração). IGF-1, Fator 1 de Crescimento Insulina-semelhante; APN, adiponectina, inibidor-1 do ativador do plasminogênio PAI-1; ativador do plasminogênio tissular tPA; uroquinase - tipo plasminogênio ativador do receptor uPA; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; PI3K, fosfoinositídeo 3-quinase; COX-2, ciclooxigenase-2. Adaptada referência 86.

Hipóxia intermitente e obesidade, duas condições patológicas comumente encontradas em pacientes com apneia obstrutiva do sono, contribuem potencialmente na progressão tumoral.⁸⁸ O principal potencial mecanismo envolvido, tanto na hipóxia intermitente como na obesidade, é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que contribui no aumento do tumor,^{87, 89} promovendo a angiogênese.

Portanto, obesidade é fator de risco para apneias obstrutivas do sono. A associação entre obesidade e câncer^{85, 90} é bem estabelecida, porém, a associação entre câncer e apneias do sono é pouco conhecida e estudada.^{88, 91, 92, 93}

2.2.2 HIPÓXIA E NEOPLASIAS

O microambiente tecidual tem função determinante na sobrevivência e no crescimento celular, podendo contribuir para a transformação celular e para o desenvolvimento de tumores. Ou seja, alterações na demanda de oxigênio nos tecidos, tornando-os hipóxicos, podem comprometer de forma aguda as funções biológicas normais e resultar em condições patológicas como doença vascular crônica, doença pulmonar e câncer.⁹⁴

Neoplasias humanas frequentemente contêm áreas de necrose, devido aos baixos níveis de O₂ que chegam a concentrações próximas de zero. As células mais próximas de um vaso sanguíneo perfundido são expostas a concentrações de O₂ relativamente elevadas, que declinam como o distanciamento dos tumores a partir do aumento dos vasos sanguíneos.⁹⁵ Tais condições hipóxicas induzem respostas moleculares, como a ativação de fatores chave da transcrição e como o HIF-1 α ,⁹⁶ que pode ser observado na figura 16. O HIF-1 α media as respostas adaptativas das células tumorais, nas quais os mecanismos de *feedback* normais foram interrompidos por mutação somática e mudanças epigenéticas. As células tumorais passam a se adequar à hipóxia com o crescimento do tumor, resultando, dessa forma, em alterações biológicas que determinam respostas negativas às terapias,⁹⁷ uma vez que a adaptação ao novo microambiente é uma força motriz importante na seleção clonal que leva à doença invasiva e metastática.^{70, 98}

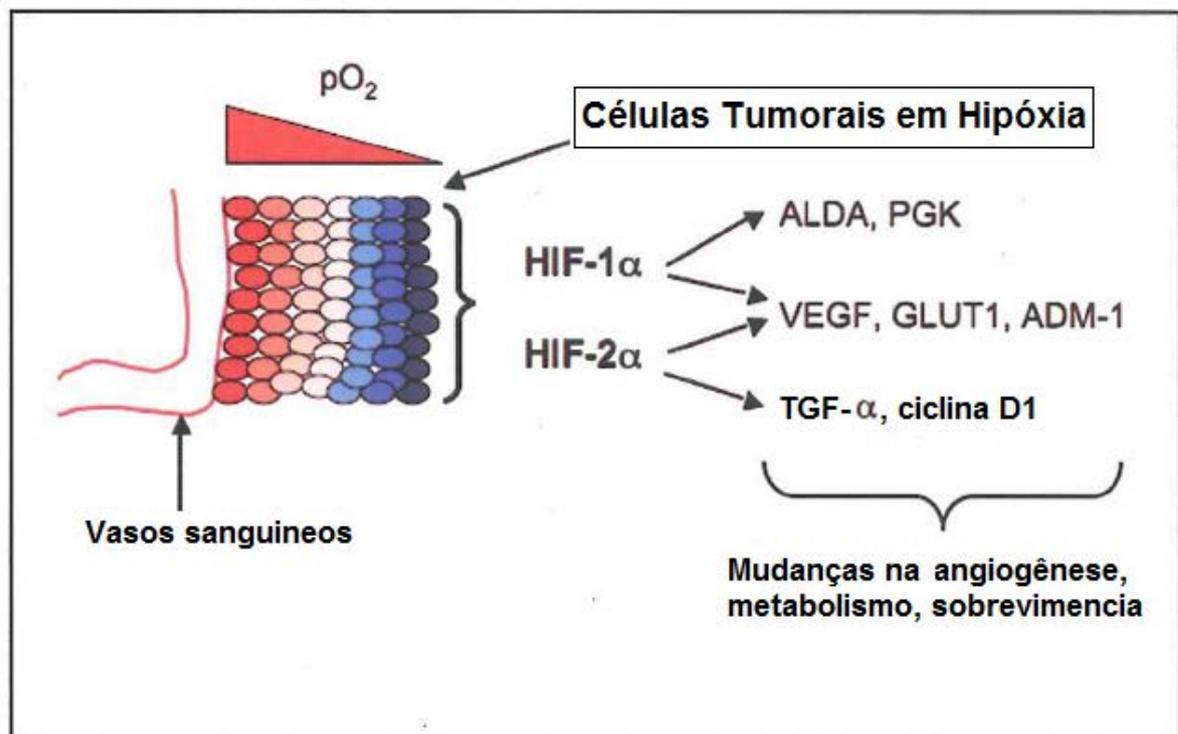


Figura 15 - Visão tradicional dos HIFs na progressão tumoral. As células tumorais que residem mais próximo aos vasos sanguíneos estão relativamente bem oxigenadas (vermelho), enquanto as que estão em locais mais distantes estão em hipóxia (azul). A estabilização de proteínas HIF- α nestas células estimula a expressão de genes alvo que codificam numerosos fatores que medeiam a adaptação ao stress hipóxico. Alguns genes alvo são regulados especificamente pelo HIF-1 α , tais como os que codificam as enzimas glicolíticas ALDA e PGK, ao passo que outros são alvos específicos de HIF-2 α , tais como o TGF- α e a ciclina D1. A maioria dos genes HIF-alvo são regulados pela HIF-1 α e-2 α , incluindo aqueles que codificam citocinas angiogênicas VEGF e transportador de glicose GLUT1. Adaptada referência 99.

2.2.3 HIFS E REGULAÇÃO GENÉTICA

O estresse celular causado no ambiente tecidual pela hipóxia induz a uma resposta única, que envolve, inicialmente, uma resposta do DNA aos danos da hipóxia aguda e reoxigenação, seguida por uma resposta à hipóxia crônica prolongada, na qual selecionadas vias de reparação de DNA são coordenadamente suprimidas.⁹⁹

Nas neoplasias, o fator de transcrição HIF-1 α regula inúmeros genes recrutados por células tumorais que buscam sobrevivência, resistência ao tratamento e fuga do ambiente privado de nutrientes. Na figura 17, ilustra-se o efeito do HIF na progressão tumoral.

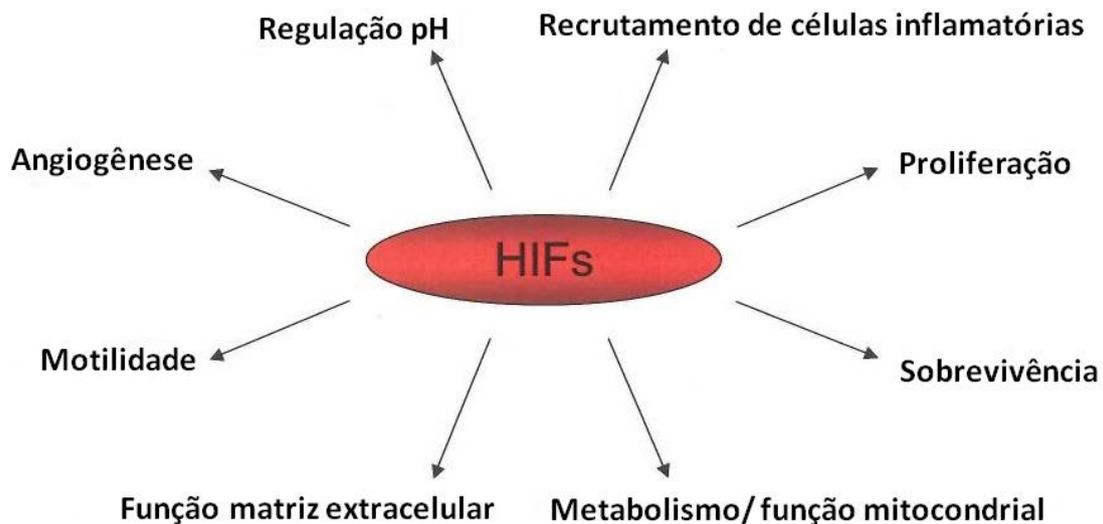


Figura 16 - Genes ativados por fatores indutores de hipóxia (HIFs) envolvidos na progressão tumoral. Genes que codificam para proteínas envolvidas em numerosos aspectos da iniciação do tumor, crescimento e metástase são transcricionalmente ativados por codificação de HIF-1 α ou HIF-2 α . Os exemplos incluem: recrutamento de células inflamatórias (SDF-1 α , CXCR4), de proliferação (ciclina D2, IGF-2), de sobrevivência (VEGF, eritropoietina), metabolismo/função mitocondrial (enzimas glicolíticas, PDK-1), a função de matriz extracelular (fibronectina -1, regulação do colágeno tipo-5), motilidade (c-MET, SPF-1 α), angiogênese (VEGF, PDGF) e pH (anidrase carbônica-9). Adaptada referência 110. As proteínas codificadas pelos genes transcritos e pelos fatores induzíveis por hipóxia desempenham papéis fundamentais na biologia do tumor, incluindo a angiogênese,¹⁰⁰ a sobrevivência celular, a resistência à quimioterapia e radioterapia,¹⁰¹ e a instabilidade genética.^{99, 102, 103, 104, 105}

HIF-1 α e HIF-2 α exercem efeitos sobre a progressão tumoral por ligação e ativação da transcrição de genes alvo que respondem à hipóxia.⁵⁹ A tabela 3 demonstra genes-alvo HIF-1 α , cujos produtos contribuem para a progressão tumoral.

Tabela 3 – Seleção de genes-alvo HIF-1, cujos produtos contribuem para a progressão tumoral. Adaptada referência 70.

Produto do Gene	Papel na progressão tumoral
Angiopietina2	Angiogênese, linfangiogênese
Angiopietina 4-like	Metástases
Proteína de resistência do câncer de mama (ABCG2)	Transporte de multirresistência, manutenção de células-tronco
Anidrase carbônica 9 e 12	Regulação do pH
C-MET	Invasão
CXCR4	Metástases
DEC1	Instabilidade genômica
Endotelina1	Invasão
Fibronectina1	Invasão
Isomerase glicose fosfato	Mobilidade celular, metabolismo da glicose, imortalização
Transportador de glicose 1	Captação da glicose
Hexoquinase1 e 2	Fosforilação da glicose, sobrevivência celular
Inibidor 2 de diferenciação	Angiogênese, proliferação
Fator 2 de crescimento insulina-semelhante	Sobrevivência celular, proliferação.
JARID1B	Manutenção de células-tronco

Angiogênese KIT-ligante (fator de células-tronco)	Manutenção de células-tronco
Lactato desidrogenase A	Metabolismo da glicose
Lisil oxidase	Metástases
Metaloproteinases de matriz de 2 e 14 de	Invasão
NT5E (ecto-5'-nucleotidase/CD73)	Evasão imune, multirresistência.
OCT4	Manutenção de células-tronco
Fator de crescimento placentário	Angiogênese
Fator B de crescimento derivado plaquetário	Proliferação celular, sobrevivência e angiogênese.
Piruvato desidrogenase quinase 1	Metabolismo da glicose
Fator derivado de estroma 1	Angiogênese
Survivina	Sobrevivência celular
Telomerase	Imortalidade
Fator α de crescimento transformador (TGF- α)	Proliferação celular e sobrevivência
TWIST1 epitelial	Transição mesenquimal
Receptor para ativador uroquinase plasminogênio	Invasão
Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)	Angiogênese
WSB1	Sobrevivência celular
ZEB1 (ZFHX1A), ZEB2 (ZFHX1B)	Transição epitelial-mesenquimal

2.1.3 IMPLICAÇÕES TEREPÊUTICAS DA HIPÓXIA TUMORAL

Em 1953, Gray et al. hipotizaram a ligação entre oxigenação dos tecidos e radio resistência das células tumorais por um princípio denominado “efeito do aumento de O_2 ”,¹⁰⁶ no qual se pensou que o oxigênio agisse como um radiosensibilizador direto, aumentando os danos ao DNA através da formação de radicais livres. Em 1980, Brown JM demonstrou o efeito do oxigênio necessário para estar presente na hora exata da radiação, levantando a "hipótese da fixação de oxigênio",¹⁰⁷ que pode ser vista na figura 17.

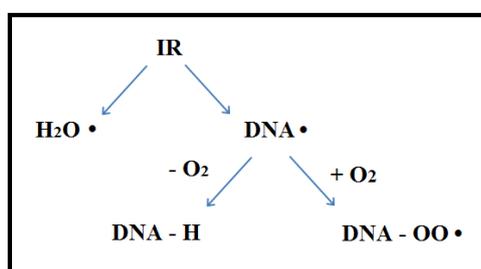


Figura 17 – A hipótese da fixação de oxigênio. A irradiação nas células gera radicais livres de DNA ou de moléculas de água (H_2O). Os radicais livres de DNA ($DNA \bullet$) podem reagir com moléculas de O_2 disponíveis, gerando um radical peroxi- ($DNA - OO \bullet$), modificando quimicamente o DNA ("fixação de oxigênio"). Na ausência de O_2 , o radical de DNA será reduzido, recuperando a sua composição original ($DNA - H$). Além dos efeitos diretos ao DNA, os radicais livres produzidos a partir de H_2O ($H_2O \bullet$) podem ainda danificar o DNA nas proximidades. Adaptada referência 110.

A partir desse momento, surgiram as primeiras tentativas de explorar o efeito do oxigênio para o benefício terapêutico, focadas em intervenções para aumentar a oxigenação do tumor durante a radiação. Como alternativa, as estratégias mais recentes tentaram tirar vantagem da hipóxia para matar seletivamente as células tumorais, modulando o O_2 , que, além de controlar múltiplas vias que contribuem para a indução de danos ao DNA por radiação, também induz efeitos biológicos nas células tumorais, por modular suas respostas às terapias e conferindo resistência à quimioterapia.¹⁰⁸

A hipóxia exerce uma pressão seletiva sobre as células para a perda do p53, um importante mediador da apoptose,^{109, 110} e aumenta a expressão do gene de resistência a

múltiplas drogas (MDR1),¹¹¹ levando ao efluxo de drogas quimioterápicas. A hipóxia também contribui no aumento das taxas de mutagênese e metástases.^{112, 113}

Contudo, a compreensão dos caminhos que regulam a hipóxia, bem como a identificação de alvos do HIF produziram numerosos alvos moleculares para intervenção terapêutica. A segmentação da via HIF gerou grande atenção, devido ao seu potencial para marcar seletivamente as células hipóxicas tumorais, e devido ao papel que a hipóxia desempenha nos processos tumorigênicos-chave, como angiogênese, metástase e metabolismo.

As estratégias de maior potencial terapêutico são as que bloqueiam a acumulação HIF, quer por inibição da tradução quer por promoção da degradação; e as que inibem a ligação aos genes HIF alvo, tais como VEGF, TGF α ou lisil oxidase.¹⁰⁸ Também buscam-se alternativas em numerosas outras pequenas moléculas, como os inibidores da topoisomerase, os desestabilizadores do microtúbulo, e os inibidores de histona desacetilase e da acumulação de HIF-1 α (embora os mecanismos para esses efeitos não sejam claros).¹¹⁴

Apesar das dificuldades em atacar diretamente os fatores de transcrição, drogas contra vários alvos transcricionais HIF-alvo foram desenvolvidas e aprovadas para uso clínico. A principal delas é o bevacizumab (Avastin®, Genentech®), um anticorpo monoclonal contra o VEGF, um fator de crescimento endotelial chave envolvido na angiogênese tumoral.¹¹⁵ Os efeitos terapêuticos de anti-VEGF parecem envolver vários mecanismos, muitas vezes dependendo do tipo de tumor e do regime de quimioterapia, e incluem a inibição da angiogênese, a apoptose das células endoteliais e a normalização da vasculatura.¹¹⁶

2.3 HIPÓXIA INTERMITENTE E CANCER

A relação entre hipóxia intermitente, que ocorre na Síndrome da Apneia Obstrutiva, e câncer tem sido pouco investigada. Campos-Rodriguez F. et al (2012) abordaram pela primeira vez a associação entre SAOS e a incidência de câncer em seres humanos. Os autores concluíram que o aumento da hipóxia durante a noite está associada ao aumento da incidência de câncer. O estudo, porém, se limita a homens e pacientes com menos de 65 anos de idade,

Almendros I. et al relataram, em 2012, que a hipóxia intermitente, simulada em camundongos, e semelhante à encontrada na SAOS grave, aumenta o crescimento do tumor,

a necrose tumoral, e as metástases de pulmão em comparação a camundongos sujeitos a normoxia.^{88, 92} Esses resultados são consistentes com a primeira evidência humana sobre a relação entre SAOS e mortalidade excessiva por câncer fornecido pelo Sleep Cohort Wisconsin. Nesta coorte de base populacional, os indivíduos com IAH maior ou igual a 30 mostraram um risco ajustado de mortalidade por câncer de 4,8 (IC 95%, 1,7-13,2), em comparação a indivíduos sem apneia (IAH <5). A associação foi ainda maior quando analisada a porcentagem de tempo de sono com CO₂ menor de 90% (ajustado por risco, 8,6, 95% CI, 2,6-28,7).¹¹⁷

Em relação aos mecanismos que possam estar envolvidos no desenvolvimento de neoplasias em pacientes com OSA, a principal hipótese é a de que diferentes vias desencadeadas pela hipóxia intermitente possam desempenhar papéis-chave.

Estudos recentes, apesar de terem avaliado a hipóxia durante a noite e não especificamente a hipóxia intermitente, concluíram que a elevação dos níveis de espécies reativas de O₂ durante os períodos de reoxigenação podem alterar a expressão gênica através da regulação da atividade de alguns fatores de transcrição e de vias de sinalização envolvidas na tumorigênese.^{118, 119} O aumento do estresse oxidativo tem sido relatado como um fator de risco para o desenvolvimento de alguns tumores sólidos e hematológicos,^{120, 121} assim como vários parâmetros de gravidade da OSA, como oximetria, foram correlacionados ao stress oxidativo.^{122, 123}

Além disso, tanto hipóxia crônica e intermitente como as espécies reativas de O₂ podem ativar os fatores de transcrição, tais como o fator I-alfa induzível por hipóxia, que promovem a angiogênese e contribuem com a progressão tumoral.

2.4 MELANOMA

O melanoma é uma neoplasia que afeta especificamente o tecido epitelial, e pode se metastizar caso não seja detectado e tratado nas fases iniciais. Sua taxa de incidência é alta, 20,1 por 100 mil pessoas em 2007,¹²⁴ resultando, mundialmente, em um problema de saúde pública. Dados epidemiológicos americanos projetaram que 55.560 novos casos de melanoma *in situ* foram recém-diagnosticados em 2012.⁷⁵ No Brasil, um estudo baseado em relatórios

anatomopatológicos revelou que o melanoma corresponde a 0,15% de todas as neoplasias malignas.¹²⁵

Melanomas são neoplasias malignas que surgem a partir de melanócitos. Os melanócitos são células dendríticas pigmentadas de origem neuroectodérmica, que migram para a camada basal da epiderme. A função de melanócitos é a produção de melanina, um pigmento protetor da pele, em resposta aos raios ultravioletas (UV).¹²⁶

A transformação dos melanócitos em células tumorais ocorre tanto em pacientes normais como em geneticamente predispostos. Embora melanoma seja uma neoplasia complexa e não totalmente esclarecida, é provável que envolva interações com fatores ambientais, acúmulo de alterações genéticas sequenciais, ativação de oncogêneses, inativação de genes supressores tumorais e reparo prejudicada do DNA.^{127, 128}

A progressão tumoral do melanoma envolve três fases: 1) em um tumor em fase inicial, o melanoma pode ser confinado à epiderme, exibindo apenas o crescimento radial ou lateral; 2) quando o melanoma progride, pode evoluir para melanoma microinvasivo, no qual as extensões microscópicas invadem a derme papilar superficial; 3) melanomas mais avançados podem progredir para a fase de crescimento vertical, que é caracterizada por um crescimento invasivo com envolvimento da derme. A fase de crescimento vertical representa um evento chave para a propagação de células, uma vez que permite que as células migrem profundamente na derme, nos vasos linfáticos, e na corrente sanguínea.¹²⁹ Neste estágio de crescimento, o melanoma ganha potencial metastático.¹³⁰

Na sétima revisão do American Joint Committee on Cancer (AJCC) para o estadiamento e a classificação do melanoma e, 2009, os pacientes podem ser divididos em quatro etapas, a partir da fase I e II (doença local) para o estágio III (doença loco-regional) e IV fase (doença metastática).¹³¹

O processo de metástases envolve a propagação de células neoplásicas para locais do corpo loco-regionais ou distantes através dos vasos linfáticos e / ou da corrente sanguínea. No caso de melanoma, as células circulantes podem encontrar um microambiente apropriado no primeiro linfonodo de drenagem, conhecido como o gânglio linfático sentinela, em outros linfonodos ou em órgãos distantes, conduzindo ao crescimento do tumor secundário, em quase todos os órgãos, com predileção para os gânglios linfáticos, fígado, pulmões, cérebro e ossos. Melanoma metastático tem uma predileção bem conhecida para a propagação à

distância, cujo tempo médio de sobrevivência é de 6 a 9 meses.¹³² Muitos genes diferentes têm sido associados ao aumento do risco para o melanoma. As mutações mais bem caracterizadas envolvem os produtos dos genes altamente penetrantes de síndromes melanoma familiar: p16, também chamado de ciclina dependente de quinase inibidor 2A (CDKN2A), quadro de leitura alternativo (IRA), e quinase dependente de ciclina 4 (CDK4).¹³³

Embora a pesquisa genética sobre a tumorigênese se destaque, inúmeros outros fatores de risco para o melanoma estão bem documentados: radiação UV natural e artificial, história pregressa e familiar, nevos, e aumento da contaminação do meio ambiente com compostos químicos cancerígenos,¹³⁴ entre outros.

Quatro principais subtipos de melanoma têm sido descritos: melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma-maligno lentigo e melanoma acrolentiginoso. Os subtipos menos comuns incluem melanoma nevoide, melanoma desmoplásico, sarcoma de células claras, e melanoma dérmico solitário.¹³³

A compreensão da biologia melanoma e do mecanismo de metástases fornece novos alvos moleculares e pode ajudar a descobrir novos biomarcadores.

2.5 BIOMARCADORES NO MELANOMA E NA HIPÓXIA

O objetivo das investigações no campo dos biomarcadores é avaliar marcadores para a detecção precoce de um tumor em crescimento, para a detecção de metástases, e para monitorização terapêutica através de métodos não invasivos. O biomarcador ideal deve ser uma molécula detectável e / ou mensurável no sangue ou em outros compartimentos de fluidos corporais, acessíveis de forma minimamente invasível, permitindo o diagnóstico de um tumor em crescimento ou para a previsão da resposta provável de um paciente para um determinado tratamento. Desse modo, o biomarcador deve apresentar sensibilidade e especificidade suficientes para minimizar falsos negativos, bem como resultados positivos falsos.

Biomarcadores podem ser divididos em marcadores de diagnóstico para o rastreamento e prognóstico de marcadores, que podem ser utilizadas uma vez que o câncer tenha sido

diagnosticado e marcadores preditivos, que devem prever a resposta provável a um tratamento. Nesse momento ainda não existe o biomarcador ideal no campo do melanoma.

Como potenciais marcadores não invasivos, particularmente, no melanoma cutâneo, várias proteínas e outras moléculas estão sob investigação. Tais possíveis biomarcadores compreendem, por um lado, enzimas, proteínas ou antígenos solúveis e proteínas S100, e, por outro, metabolitos relacionados à melanina e a células-livre ácidos nucleicos circulantes. Esses potenciais biomarcadores são discutidos a respeito de seu valor prognóstico e preditivo no diagnóstico de melanoma, bem como prognóstico e acompanhamento do tratamento.¹²⁶

2.5.1 BIOMARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO MELANOCÍTICA

Os melanomas primários e metastáticos manifestam inúmeros padrões morfológicos e tem um amplo espectro de características histológicas que mimetizam outras neoplasias, como linfomas, carcinomas pouco diferenciados, tumores neuroendócrinos, sarcomas e tumores de células germinativas,¹³⁵ aumentando os problemas no diagnóstico diferencial. Normalmente são marcadas como melanoma, proteínas S100, NKIC3, HMB-45, Melan-A e tirosinase positivo.¹³⁶

2.5.1.1 HMB-45

Anticorpo marcador de melanoma humano-45 (HMB-45), um marcador da glicoproteína pré-melanossoma citoplasmática gp100, foi um dos primeiro marcadores melanoma 'específicos' descobertos.¹³⁷ Com uma sensibilidade de 69-93% (77-100% dos melanomas primários e 56-83% dos melanomas metastáticos),¹³⁸ ele não é tão sensível quanto S100, mas tem maior especificidade. HMB-45 mostrou expressão máxima em amostras de melanoma primário (77-100%) e menor em metástases (58-83%).^{139, 140,} Em lesões melanocíticas positivas, HMB-45 é expresso no citoplasma.¹⁴¹

2.5.1.2 MELAN-A

O antígeno de melanoma reconhecido por células-T 1 (Melan-A), também conhecido como (MART-1), trata-se de uma proteína citoplasmática de diferenciação melanossômica reconhecida por células-T. Os dois clones do anticorpo para a proteína estão disponíveis: o M2-7C10, geralmente referido como MART-1 e o A103, geralmente referido como Melan-

A.¹⁴² Estes anticorpos apresentaram uma sensibilidade de 75 a 92% e especificidade de 95 a 100%,¹⁴³ para o melanoma, semelhante ao HMB-45.

2.5.1.3 S100-B

Proteínas S100 têm a função de regular fosforilação de proteínas, dinâmica de componentes do citoesqueleto; assim como de ativar as enzimas e fatores de transcrição, o crescimento celular, diferenciação, e os processos inflamatórios.¹⁴⁴

A proteína B ligante de cálcio (S100-B) é uma proteína dimérica de 21 kd, que consiste em duas subunidades β . Esta proteína é um membro de uma família de proteínas de 19 e foi isolado pela primeira vez a partir de cérebro de bovino em meados dos anos sessenta. A proteína S100-B é expressa pelas células da glia e melanócitos e tem sido mostrada, como sendo produzida por tumores cerebrais e melanoma. estando sobre reguladas em tumores agressivos, avançados, e metastáticos em relação ao não invasivo e não metastático.^{145, 146}

Em melanomas, S100-B está presente no núcleo e no citoplasma e tem uma sensibilidade de 97-100%,^{139, 147} e especificidade de 75-87%.¹³⁸

S100-B intracelular influencia múltiplos e subestimados processos celulares, como a proliferação, a sobrevivência e a locomoção das células, a fosforilação da proteína e sua degradação, bem como da homeostase do cálcio, estando envolvida na regulação do citoesqueleto e nas interações de atividades enzimáticas.⁸⁴ S100-B provavelmente contribui para a progressão tumoral por down-regulação do gene supressor tumoral p53.¹⁴⁸ S100-B ativamente secretada pode servir como um ativador autócrino ou parácrino de receptores de superfície celular, tais como o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), resultando na estimulação da pro-proliferação, bem como em mecanismos pro-diferenciação.^{84, 149}

Aumento dos níveis séricos de S100-B em pacientes com melanoma são principalmente atribuídos à perda de integridade celular e à degradação proteolítica como resultado da apoptose e da necrose das células tumorais.⁸¹ As concentrações séricas de S100-B estão ligadas à carga tumoral¹²⁹ e estão correlacionadas ao estágio clínico do melanoma, com baixos índices nos níveis I e II, índices elevados na fase III, e índices mais altos em estágio IV.¹⁵⁰

2.5.2 BIOMARCADORES DE PROLIFERAÇÃO TUMORAL

Com o objetivo de elucidar os mecanismos de tumorigênese do melanoma, inúmeros estudos descrevem o papel dos biomarcadores de proliferação, na avaliação dos tumores melanocíticos. No entanto, existem duas aplicações clínicas que justificam o estudo destes marcadores: diferenciação de nevos benignos em relação aos melanomas malignos, e avaliação de prognóstico clínico em pacientes com melanoma maligno.

2.5.2.1 PCNA

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um marcador de proliferação cujos picos de expressão ocorrem nas fases G1 e S do ciclo celular.¹⁵¹ Ele funciona como a proteína acessória para δ DNA polimerase, necessária para a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) cromossômico na fase S, e interage com as proteínas celulares envolvidas na regulação do ciclo celular e checkpoint.¹⁵²

O PCNA circunda a cadeia dupla DNA como um trímero, formando uma pinça deslizante que amarra proteínas, tais como polimerases de DNA.^{153, 154} PCNA é essencial não só para a replicação do DNA, mas também para várias formas de reparação do DNA,¹⁵⁵ incluindo a reparação da excisão de nucleotídeos, a via principal através da qual as células removem danos do DNA introduzidos através da luz ultra violeta e uma variedade de carcinógenos químicos.¹⁵⁶

PCNA também atua negativamente sobre o ciclo celular, ligando-se à região terminal C da p21, resultando na inibição da replicação do DNA.¹⁵⁷

2.5.2.2 Ki-67

O antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67 é uma proteína nuclear e nucleolar, firmemente associado à proliferação das células somáticas,¹⁵⁸ mais amplamente utilizado na Patologia. O Ki-67 está presente no núcleo das células em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S e G2), bem como na mitose,¹⁵⁹ porém ausente na fase quiescente ou fase G0.¹⁶⁰ Com isso, Ki-67 é um excelente marcador para determinar a fração de crescimento celular em vários tumores,¹⁵⁷ como consequência, é potencialmente o marcador mais sensível para detectar a proliferação celular de mitoses.¹⁶¹

A expressão de Ki-67 em lesões melanocíticas, tem sido proposta como um biomarcador de diagnóstico adjuvante,¹⁶² na distinção entre nevos benignos e melanomas, e reforça seu papel como um biomarcador de prognóstico em melanomas.¹⁶³

2.5.3 BIOMARCADOR DE PROGRESSÃO TUMORAL

2.5.3.1 TGF- β

As células são capazes de alterar o seu fenótipo, incluindo a morfologia, o comportamento do crescimento, características de adesão e motilidade, quando encontram um microambiente diferente. O processo de transição de células epiteliais para mesenquimais (TEM) é caracterizado por uma diminuição nos marcadores de células epiteliais [por exemplo, a E-caderina (Ecad)], um aumento dos marcadores de células mesenquimais [por exemplo, vimentina e fibronectina (FN)], uma mudança morfológica de células epiteliais para células de motilidade fibroblástica e motilidade celular reforçada.¹⁶⁴

Na progressão tumoral, a TEM é um processo de base celular, estimulado pelo fator de crescimento transformante Beta (TGF- β),¹⁶⁵ que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento embrionário normal, na progressão tumoral e no extravasamento de células metastáticas.¹⁶⁶ Estudos fundamentam o conceito de que o processo de transição de células epiteliais para mesenquimais fornece bases para alterações fenotípicas na embriogênese,¹⁶⁷ e no desenvolvimento de doenças, incluindo a progressão ao câncer.^{164, 168} Hung SP (2012) mostrou que a secreção elevada TGF- β 1 por células-tronco mesenquimais (CTMs), sob hipóxia, promove o crescimento, motilidade e maior capacidade de invasão celular do câncer de mama.¹⁶⁹

O TGF- β foi descrito pela primeira vez como indutor de TEM em células epiteliais mamárias normais por sinalização através de complexos receptores de serina/treonina quinase.¹⁷⁰ Contudo, o TGF- β pode atuar como biomarcador na progressão do câncer através da modulação do processo de transição de células epiteliais para mesenquimais.

2.5.4 BIOMARCADOR DE NECROSE TUMORAL E HIPÓXIA

2.5.4.1 HIF-1 α

Regiões de necrose demarcaram regiões de hipóxia crônica e intensa.¹⁷¹ A hipóxia é um importante fator na carcinogênese, pois torna o fenótipo mais agressivo, com aumento da invasão e proliferação, formação de metástases, e menor sobrevida.^{172, 173, 174}

Em resposta à hipóxia, as células tumorais alteram o seu metabolismo e ativam genes, garantido sua sobrevivência e promovendo a angiogênese, alterações metabólicas e metástases. HIF-1 α desempenha um papel essencial na resposta adaptativa das células à hipóxia, e está associado com o comportamento tumoral agressivo.¹⁷⁵

2.5.5 BIOMARCADOR DE APOPTOSE

2.5.5.1 CASPASE

A hipóxia, ativada pelo HIF-1 α , está associada a alterações celulares, incluindo o aumento da resistência à apoptose,¹⁷⁶ ou seja, algumas células se adaptam ao stress e se tornam mais a lesões ou apoptose. HIF-1 α transcreve proteínas antiapoptóticas, incluindo a proteína inibidora de apoptose (IAP), especificamente cIAP-2,¹⁷⁷ o que representa um importante fator de sobrevivência para as células tumorais.

Yan W, et al (2012), mostraram que células hipóxicas de carcinoma hepatocelular, ativam vias de sinalização para induzir a ativação de caspase-1 com a subsequente produção de vários mediadores inflamatórios, os quais, por sua vez, promovem a invasão tumoral e metastização.¹⁷⁸

3. JUSTIFICATIVAS

1. Câncer é uma doença comum de alta relevância.
2. Melanoma cresce mais em camundongos expostos à hipóxia intermitente.
3. Não existem dados sobre quais marcadores de progressão de tumores são ativados pela hipóxia intermitente.
4. Entender os mecanismos da progressão do melanoma na hipóxia intermitente pode ser translacionado para pacientes com apneia do sono e para a oncologia em geral.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito da hipóxia intermitente em marcadores de melanoma em modelo de apneia do sono em camundongos.

4.2 Específicos

Avaliar o efeito da hipóxia intermitente nos marcadores de densidade de melanócitos de melanoma, HMB-45, Melan-A e S100-B, em modelo de apneia do sono em camundongo.

Avaliar o efeito da hipóxia intermitente nos marcadores de progressão de melanoma, Ki-67 e PCNA, em modelo de apneia do sono em camundongo.

Avaliar o efeito da hipóxia intermitente no marcador de progressão tumoral, TGF- β , em modelo de apneia do sono em camundongo.

Avaliar o efeito da hipóxia intermitente no marcador de hipóxia e necrose tumoral, HIF-1 α , em modelo de apneia do sono em camundongo.

Avaliar o efeito da hipóxia intermitente no marcador de apoptose, TGF- β , em modelo de apneia do sono em camundongo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

- ¹ Weitzman ED, Czeisler CA, Zimmerman JC, Ronda JM. Timing of REM and stages 3 + 4 sleep during temporal isolation in man. *Sleep*. 1980;2(4):391-407.
- ² Aschoff J, Wever R. Circadian rhythms of finches in light-dark cycles with interposed twilights. *Comp Biochem Physiol*. 1965 Dec;16(4):507-14.
- ³ HALBERG F. [Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle]. *Int Z Vitaminforsch Beih*. 1959;10:225-96.
- ⁴ Knutson KL. Impact of sleep and sleep loss on glucose homeostasis and appetite regulation. *Sleep Med Clin*. 2007 Jun;2(2):187-197.
- ⁵ Sustained sleep restriction reduces emotional and physical well-being. *Pain*. 2005 Dec 15;119(1-3):56-64.
- ⁶ Lim J, Dinges DF. Sleep deprivation and vigilant attention. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1129:305-22.
- ⁷ Dworak M, McCarley RW, Kim T, Kalinchuk AV, Basheer R. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep. *J Neurosci*. 2010 Jun 30;30(26):9007-16.
- ⁸ Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk AV. Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis. *Sleep Med Rev*. 2011 Apr;15(2):123-35.
- ⁹ Iber C, Ancoli-Israel S, Quan SF: The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology, and technical specifications. For the American Academy of Sleep Medicine 1st ed. Westchester, Ill, American Academy of Sleep Medicine, 2007.
- ¹⁰ Carkasdon MA, Dement, WC. Normal human sleep: an overview. In: *Principles and Practice of Sleep Medicine*, 4th Edition; edited by Meir H. Kryger, Thomas Roth, and William C. Dement, Elsevier Saunders; 2005.

-
- ¹¹ Rechtschaffen A, Kales A (eds): A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages of Human Sleep. Los Angeles: Brain Information Service/Brain Research Institute, UCLA, 1968.
- ¹² Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep*. 2002 Feb 1;25(1):18-24.
- ¹³ Kushida CA, Littner MR, Morgenthaler TM. et al. "Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures: An update for 2005". *Sleep*. 2005;28:499–519.
- ¹⁴ Yilmaz B, Asyali MH, Arikan E, Yetkin S, Ozgen F. Sleep stage and obstructive apneic epoch classification using single-lead ECG. *Biomed Eng. Online*. 2010 Aug 19;9:39.
- ¹⁵ Edwards BA, O'Driscoll DM, Ali A, Jordan AS, Trinder J, Malhotra A. Aging and sleep: physiology and pathophysiology. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010 Oct;31(5):618-33.
- ¹⁶ Santos-Silva R, Bittencourt LR, Pires ML, de Mello MT, Taddei JA, Benedito-Silva AA, Pompeia C, Tufik S. Increasing trends of sleep complaints in the city of Sao Paulo, Brazil. *Sleep Med*. 2010 Jun;11(6):520-4.
- ¹⁷ Banno K, Kryger MH. Sleep apnea: clinical investigations in humans. *Sleep Med*. 2007;8:400-426.
- ¹⁸ Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. "Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective". *Am J Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002;165(9):1217–39.
- ¹⁹ Demsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev*. 2010 Jan;90(1):47-112.
- ²⁰ Morgenthaler TI, Kagramanov V, Hanak V, Decker PA. "Complex sleep apnea syndrome: is it a unique clinical syndrome?". *Sleep*. 2006;29(9):1203–9.
- ²¹ Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet*. 2002 Jul 20;360(9328):237-45.
- ²² Eckert DJ, Malhotra A. Pathophysiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Feb 15;5(2):144-53.

-
- ²³ Bradley TD, Floras JS. Sleep apnea and heart failure: Part II: central sleep apnea. *Circulation*. 2003 Apr 8;107(13):1822-6.
- ²⁴ Drazen JM. Sleep apnea syndrome. *N Engl J Med*. 2002 Feb 7;346(6):390.
- ²⁵ Ford DE, Kamerow DB. Epidemiologic study of sleep disturbances and psychiatric disorders. An opportunity for prevention? *JAMA*. 1989 Sep 15;262(11):1479-84.
- ²⁶ Cross RL, Kumar R, Macey PM, Doering LV, Alger JR, Yan-Go FL, Harper RM. Neural alterations and depressive symptoms in obstructive sleep apnea patients. *Sleep*. 2008 Aug;31(8):1103-9.
- ²⁷ Caples SM, Garcia-Touchard A, Somers VK. Sleep-disordered breathing and cardiovascular risk. *Sleep*. 2007 Mar;30(3):291-303.
- ²⁸ Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, Daniels S, Floras JS, Hunt CE, Olson LJ, Pickering TG, Russell R, Woo M, Young T; American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology; American Heart Association Stroke Council; American Heart Association Council on Cardiovascular Nursing; American College of Cardiology Foundation. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/american College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation*. 2008 Sep 2;118(10):1080-111.
- ²⁹ Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med*. 2005 Nov 10;353(19):2034-41.
- ³⁰ Strollo PJ Jr, Rogers RM. Obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 1996 Jan 11;334(2):99-104.

-
- ³¹ Johns, MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 1991;14(6):540-5.
- ³² Bradley TD, Floras JS. Sleep apnea and heart failure: Part II: central sleep apnea. *Circulation*. 2003 Apr 8;107(13):1822-6.
- ³³ Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Marcus CL and Vaughn BV for the American Academy of Sleep Medicine. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications, Version 2.0. www.aasmnet.org, Darien, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2012.
- ³⁴ The International Classification of Sleep Disorders: diagnostic and Coding Manual. 2nd ed. Westchester, Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine 2005.
- ³⁵ Leal TL, Alippi RM, Vargas M, León-Velarde F, Bozzini CE. Body weight loss during acute hypoxia: effects of increased convective oxygen transport or previous acclimation. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*. 1995;45(1):9-14.
- ³⁶ Lavie P. Incidence of sleep apnea in a presumably healthy working population: a significant relationship with excessive daytime sleepiness. *Sleep*. 2002 Jun 15;25(4):312-8.
- ³⁷ Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med*. 1993;328:1230-5.
- ³⁸ Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med*. 2010 May;11(5):441-6.
- ³⁹ Parati G, Lombardi C, Narkiewicz K. Sleep apnea: epidemiology, pathophysiology, and relation to cardiovascular risk. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(4):R1671-83.
- ⁴⁰ Gleeson K, Zvillich CW, White DP. The influence of increasing ventilator effort on arousal from sleep. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:295-300.
- ⁴¹ Worsnop C, Kay A, Pierce R, Kim Y, Trinder J. Activity of respiratory pump and upper airway muscles during sleep onset. *J Appl Physiol* 1998;85:908-920.

-
- ⁴² Schwab RJ, Pasirstein M, Pierson R, Mackley A, Hachadoorian R, Arens R, Maislin G, Pack AI. Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:522-30.
- ⁴³ Watanabe T, Isono S, Tanaka A, Tanzawa H, Nishino T. Contribution of body habitus and craniofacial characteristics to segmental closing pressures of the passive pharynx in patients with sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:260-5.
- ⁴⁴ Veasey SC, Davis CW, Fenik P, Zhan G, Hsu YJ, Pratico D, Gow A. Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions. *Sleep*. 2004;27:194-201.
- ⁴⁵ Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med*. 2000 May 11;342(19):1378-84.
- ⁴⁶ Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, Pickering TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA*. 2000 Apr 12;283(14):1829-36. Erratum in: *JAMA* 2002 Oct 23-30;288(16):1985.
- ⁴⁷ Wolk R, Somers VK. Cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea. *Clin Chest Med*. 2003;24:195-205.
- ⁴⁸ Fletcher EC. Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol*. 2001;90:1600-5.
- ⁴⁹ Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, Torbenson MS, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology*. 2007;45(4):1007-13.
- ⁵⁰ Ward BJ, Donnelly JL. Hypoxia induced disruption of the cardiac endothelial glycocalyx: implications for capillary permeability. *Cardiovasc Res*. 1993 Mar;27(3):384-9.
- ⁵¹ Gami AS, Howard DE, Olson EJ, Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2005;352:1206-14.

-
- ⁵² Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, Gottlieb DJ, Nawabit R, Kirchner HL, et al.; Sleep Heart Health Study. Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:910-6.
- ⁵³ Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet.* 2005;365:1046-53.
- ⁵⁴ Drager LF, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest.* 2011 Aug;140(2):534-42.
- ⁵⁵ Ronksley PE, Hemmelgarn BR, Heitman SJ, Hanly PJ, Faris PD, Quan H, et al. Obstructive sleep apnoea is associated with diabetes in sleepy subjects. *Thorax.* 2009;64:834-9.
- ⁵⁶ Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB, Young T. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:1590-5.
- ⁵⁷ Börgel J, Sanner BM, Bittlinsky A, Keskin F, Bartels NK, Buechner N, et al. Obstructive sleep apnoea and its therapy influence high-density lipoprotein cholesterol serum levels. *Eur Respir J.* 2006;27:121-7.
- ⁵⁸ Adedayo AM, Olafiranye O, Smith D, Hill A, Zizi F, Brown C, Jean-Louis G. Obstructive sleep apnea and dyslipidemia: evidence and underlying mechanism. *Sleep Breath.* 2012 Aug 18.
- ⁵⁹ Sharma SK, Agrawal S, Damodaran D, Sreenivas V, Kadiravan T, Lakshmy R, et al. CPAP for the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 2011;365:2277-86.
- ⁶⁰ Sanders MH, Kern N. Obstructive sleep apnea treated by independently adjusted inspiratory and expiratory positive airway pressures via nasal mask. Physiologic and clinical implications. *Chest.* 1990;98:317-24.
- ⁶¹ Basner RC. Continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 2007 26;356:1751-8.

-
- ⁶² Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol*. 2005 Nov;90(6):791-7.
- ⁶³ Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B. HIFs, angiogenesis and cancer. *J Cell Biochem*. 2012 Dec 5.
- ⁶⁴ Partch CL, Card PB, Amezcua CA, Gardner KH. Molecular basis of coiled coil coactivator recruitment by the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). *J Biol Chem*. 2009 May 29;284(22):15184-92.
- ⁶⁵ 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 Apr;201(Pt 8):1153-62.
- ⁶⁶ Wykoff CC, Pugh CW, Harris AL, Maxwell PH, Ratcliffe PJ. The HIF pathway: implications for patterns of gene expression in cancer. *Novartis Found Symp*. 2001;240:212-25; discussion 225-31.
- ⁶⁷ Berra E, Richard DE, Gothié E, Pouyssegur J. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett*. 2001 Feb 23;491(1-2):85-90.
- ⁶⁸ Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001 Oct 5;107(1):43-54.
- ⁶⁹ Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001 Apr 20;292(5516):468-72.
- ⁷⁰ Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010 Feb 4;29(5):625-34.

-
- ⁷¹ Altun M, Zhao B, Velasco K, Liu H, Hassink G, Paschke J, Pereira T, Lindsten K. Ubiquitin-specific protease 19 (USP19) regulates hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) during hypoxia. *J Biol Chem*. 2012 Jan 13;287(3):1962-9.
- ⁷² Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002 Apr;82(2):373-428.
- ⁷³ Bedogni B, Powell MB. Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009 Apr;22(2):166-74.
- ⁷⁴ Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011 Dec 15;12(1):9-22.
- ⁷⁵ Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
- ⁷⁶ Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Parkin DM, Ferlay J, Mathers C, Forman D, Bray F. Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. *Lancet*. 2012 Nov 24;380(9856):1840-50.
- ⁷⁷ Bray F, Møller B. Predicting the future burden of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jan;6(1):63-74.
- ⁷⁸ Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*. 2008 Sep;25(9):2097-116.
- ⁷⁹ Vucenik I, Stains JP. Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Oct;1271:37-43.
- ⁸⁰ Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2548-56.

-
- ⁸¹ Gao J, Tian J, Lv Y, Shi F, Kong F, Shi H, Zhao L. Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. *Cancer Sci.* 2009 Mar;100(3):389-95.
- ⁸² Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev.* 2012 Aug;33(4):547-94.
- ⁸³ Harvey AE, Lashinger LM, Hursting SD. The growing challenge of obesity and cancer: an inflammatory issue. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Jul;1229:45-52.
- ⁸⁴ Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev.* 2008 Apr;222:155-61.
- ⁸⁵ Hursting SD, Dunlap SM. Obesity, metabolic dysregulation, and cancer: a growing concern and an inflammatory (and microenvironmental) issue. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Oct;1271:82-7.
- ⁸⁶ Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008 Feb 16;371(9612):569-78.
- ⁸⁷ Brandon EL, Gu JW, Cantwell L, He Z, Wallace G, Hall JE. Obesity promotes melanoma tumor growth: role of leptin. *Cancer Biol Ther.* 2009 Oct;8(19):1871-9.
- ⁸⁸ Almendros I, Montserrat JM, Torres M, Bonsignore MR, Chimenti L, Navajas D, Farré R. Obesity and intermittent hypoxia increase tumor growth in a mouse model of sleep apnea. *Sleep Med.* 2012 Dec;13(10):1254-60.
- ⁸⁹ Gozal D, Lipton AJ, Jones KL. Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2002 Feb 1;25(1):59-65.
- ⁹⁰ McMillan DC, Sattar N, McArdle, CS. ABC of obesity. Obesity and cancer. *BMJ.* 2006;333(7578):1109-11.

-
- ⁹¹ Abrams B. Cancer and sleep apnea--the hypoxia connection. *Med Hypotheses*. 2007;68(1):232.
- ⁹² Almendros I, Montserrat JM, Ramírez J, Torres M, Duran-Cantolla J, Navajas D, Farré R. Intermittent hypoxia enhances cancer progression in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2012 Jan;39(1):215-7.
- ⁹³ Campos-Rodriguez F, Martinez-Garcia MA, Martinez M, Duran-Cantolla J, de la Peña M, Masdeu MJ, Gonzalez M, Del Campo F, Gallego I, Marin JM, Barbe F, Montserrat JM, Farre R; on behalf of the Spanish Sleep Network. Association Between Obstructive Sleep Apnea and Cancer Incidence in a Large Multicenter Spanish Cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jan 1;187(1):99-105.
- ⁹⁴ Semenza GL, Agani F, Feldser D, Iyer N, Kotch L, Laughner E, Yu A. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2000;475:123-30.
- ⁹⁵ Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)* 2007 Dec;85(12):1301-7.
- ⁹⁶ Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):38-47.
- ⁹⁷ Liu Y, Song X, Wang X, Wei L, Liu X, Yuan S, Lv L. Effect of chronic intermittent hypoxia on biological behavior and hypoxia-associated gene expression in lung cancer cells. *J Cell Biochem*. 2010 Oct 15;111(3):554-63.
- ⁹⁸ Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol*. 2004;381:335-54.
- ⁹⁹ Bindra RS, Crosby ME, Glazer PM. Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Jun;26(2):249-60.
- ¹⁰⁰ Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Jun;26(2):281-90.

-
- ¹⁰¹ Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*. 2004 May;5(5):429-41.
- ¹⁰² Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Jun;26(2):273-9.
- ¹⁰³ Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Jun;26(2):319-31.
- ¹⁰⁴ Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol*. 2009 Feb;19(1):12-6.
- ¹⁰⁵ Chiche J, Ilc K, Laferrière J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res*. 2009 Jan 1;69(1):358-68.
- ¹⁰⁶ Gray LH, Conger AD, Ebert M, Horseney S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol*. 1953 Dec;26(312):638-48.
- ¹⁰⁷ Brown JM. Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods Enzymol*. 2007;435:297-321.
- ¹⁰⁸ Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Dec;8(12):967-75.
- ¹⁰⁹ Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 1996 Jan 4;379(6560):88-91.
- ¹¹⁰ Lee KB, Kim KR, Huh TL, Lee YM. Proton induces apoptosis of hypoxic tumor cells by the p53-dependent and p38/JNK MAPK signaling pathways. *Int J Oncol*. 2008 Dec;33(6):1247-56.

-
- ¹¹¹ Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 2002 Jun 15;62(12):3387-94.
- ¹¹² Koshiji M, To KK, Hammer S, Kumamoto K, Harris AL, Modrich P, Huang LE. HIF-1 α induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS α expression. *Mol Cell.* 2005 Mar 18;17(6):793-803.
- ¹¹³ Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature.* 2006 Apr 27;440(7088):1222-6.
- ¹¹⁴ Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today.* 2007 Oct;12(19-20):853-9.
- ¹¹⁵ Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 May;3(5):391-400.
- ¹¹⁶ Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008 Aug;8(8):579-91.
- ¹¹⁷ Nieto FJ, Peppard PE, Young T, Finn L, Hla KM, Farré R. Sleep-disordered breathing and cancer mortality: results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Jul 15;186(2):190-4.
- ¹¹⁸ Toffoli S, Michiels C. Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *FEBS J.* 2008 Jun;275(12):2991-3002.
- ¹¹⁹ Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010 Dec 1;49(11):1603-16.
- ¹²⁰ Hole PS, Darley RL, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood.* 2011 Jun 2;117(22):5816-26.

¹²¹ Xue X, Taylor M, Anderson E, Hao C, Qu A, Greenson JK, Zimmermann EM, Gonzalez FJ, Shah YM. Hypoxia-inducible factor-2 α activation promotes colorectal cancer progression by dysregulating iron homeostasis. *Cancer Res.* 2012 May 1;72(9):2285-93.

¹²² Gozal D, Kheirandish-Gozal L. Cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea: oxidative stress, inflammation, and much more. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Feb 15;177(4):369-75.

¹²³ Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, Okamoto Y, Ohnishi Y, Suzuki T, Kimura H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest.* 2005 May;127(5):1674-9.

¹²⁴ Altekruse S, Kosary C, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2007. 2009. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/results_single/sect_01_table.01.pdf. Acessado em 27 de janeiro de 2012.

¹²⁵ NASER, Nilton. Melanoma cutâneo: estudo epidemiológico de 30 anos em cidade do sul do Brasil, de 1980-2009. *An. Bras. Dermatol.* [online]. 2011, vol.86, n.5 [cited 2013-02-04], pp.932-941. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000500011&lng=en&nrm=iso>.ISSN 0365-0596. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962011000500011>.

¹²⁶ Tandler N, Mosch B, Pietzsch J. Protein and non-protein biomarkers in melanoma: a critical update. *Amino Acids.* 2012 Dec;43(6):2203-30.

¹²⁷ Uribe P, Wistuba II, Solar A, Balestrini C, Perez-Cotapos ML, Gonzalez S. Comparative analysis of loss of heterozygosity and microsatellite instability in adult and pediatric melanoma. *Am J Dermatopathol.* 2005 Aug;27(4):279-85.

¹²⁸ Pho L, Grossman D, Leachman SA. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2006 Mar;18(2):173-9.

¹²⁹ Vereecken P, Cornelis F, Van Baren N, Vandersleyen V, Baurain JF. A synopsis of serum biomarkers in cutaneous melanoma patients. *Dermatol Res Pract.*2012;2012:260643.

-
- ¹³⁰ Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010.
- ¹³¹ American Joint Committee on Cancer. Melanoma of the Skin Staging. Disponível em <<http://www.cancerstaging.org/staging/posters/melanoma8.5x11.pdf>>. Acesso em 04 Fev. 2013.
- ¹³² Thirlwell C, Nathan P. Melanoma--part 2: management. *BMJ.* 2008 Dec 1;337:a2488.
- ¹³³ Tuong W, Cheng LS, Armstrong AW. Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. *Dermatol Clin.* 2012 Jan;30(1):113-24.
- ¹³⁴ Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology.* 2011 Sep;118(9):1881-5.
- ¹³⁵ Banerjee SS, Harris M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology.* 2000 May;36(5):387-402.
- ¹³⁶ Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J.* 2000 Aug;32(8):475-81.
- ¹³⁷ Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 2008 May;35(5):433-44.
- ¹³⁸ Trefzer U, Rietz N, Chen Y, Audring H, Herberth G, Siegel P, Reinke S, Königer P, Wu S, Ma J, Liu Y, Wang H, Sterry W, Guo Y. SM5-1: a new monoclonal antibody which is highly sensitive and specific for melanocytic lesions. *Arch Dermatol Res.* 2000 Dec;292(12):583-9.
- ¹³⁹ Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol.* 1998 Aug;11(8):740-6.
- ¹⁴⁰ Bishop PW, Menasce LP, Yates AJ, Win NA, Banerjee SS. An immunophenotypic survey of malignant melanomas. *Histopathology.* 1993 Aug;23(2):159-66.

-
- ¹⁴¹ Fernando SS, Johnson S, Bäte J. Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein, HMB-45 monoclonal antibody and NKI/C3 monoclonal antibody. *Pathology*. 1994 Jan;26(1):16-9.
- ¹⁴² Fetsch PA, Marincola FM, Abati A. The new melanoma markers: MART-1 and Melan-A (the NIH experience). *Am J Surg Pathol*. 1999 May;23(5):607-10.
- ¹⁴³ Zubovits J, Buzney E, Yu L, Duncan LM. HMB-45, S-100, NKI/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum Pathol*. 2004 Feb;35(2):217-23.
- ¹⁴⁴ Pietzsch J. S100 proteins in health and disease. *Amino Acids*. 2011 Oct;41(4):755-60.
- ¹⁴⁵ Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T. RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med*. 2007 Dec;7(8):777-89.
- ¹⁴⁶ Arumugam T, Logsdon CD. S100P: a novel therapeutic target for cancer. *Amino Acids*. 2011 Oct;41(4):893-9. Epub 2010 May 28.
- ¹⁴⁷ Fernando SS, Johnson S, Bäte J. Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein, HMB-45 monoclonal antibody and NKI/C3 monoclonal antibody. *Pathology*. 1994 Jan;26(1):16-9.
- ¹⁴⁸ Lin J, Yang Q, Wilder PT, Carrier F, Weber DJ. The calcium-binding protein S100B down-regulates p53 and apoptosis in malignant melanoma. *J Biol Chem*. 2010 Aug 27;285(35):27487-98.
- ¹⁴⁹ Leclerc E. The roles of S100 proteins and RAGE in melanoma, breakthroughs in melanoma research. In: Yohei Tanaka (ed) InTech; ISBN: 978-953-307-291-3. 2011. <http://www.intechopen.com/books/breakthroughs-in-melanoma-research/the-roles-of-s100-proteins-and-rage-in-melanoma>
- ¹⁵⁰ Egberts F, Kotthoff EM, Gerdes S, Egberts JH, Weichenthal M, Hauschild A. Comparative study of YKL-40, S-100B and LDH as monitoring tools for Stage IV melanoma. *Eur J Cancer*. 2012 Mar;48(5):695-702.

-
- ¹⁵¹ Takahashi T, Caviness VS Jr. PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *J Neurocytol.* 1993 Dec;22(12):1096-102.
- ¹⁵² Ben-Izhak O, Bar-Chana M, Sussman L, Dobiner V, Sandbank J, Cagnano M, Cohen H, Sabo E. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology.* 2002 Dec;41(6):519-25.
- ¹⁵³ Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(21):9350-9.
- ¹⁵⁴ Ellison V, Stillman B. Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS Biol.* 2003 Nov;1(2):E33.
- ¹⁵⁵ Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(21):9350-9.
- ¹⁵⁶ Hoogervorst EM, van Steeg H, de Vries A. Nucleotide excision repair- and p53-deficient mouse models in cancer research. *Mutat Res.* 2005 Jul 1;574(1-2):3-21.
- ¹⁵⁷ Unek G, Ozmen A, Kipmen-Korgun D, Korgun ET. Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. *Acta Histochem.* 2012 Jan;114(1):31-40.
- ¹⁵⁸ Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res.* 2000 Jun 15;257(2):231-7.
- ¹⁵⁹ Sawhney N, Hall PA. Ki67--structure, function, and new antibodies. *J Pathol.* 1992 Oct;168(2):161-2.
- ¹⁶⁰ Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984 Oct;133(4):1710-5.

-
- ¹⁶¹ Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*. 2002 Jan;40(1):2-11.
- ¹⁶² de Wit NJ, van Muijen GN, Ruiter DJ. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathology*. 2004 Jun;44(6):517-41.
- ¹⁶³ Li N, Mangini J, Bhawan J. New prognostic factors of cutaneous melanoma: a review of the literature. *J Cutan Pathol*. 2002 Jul;29(6):324-40.
- ¹⁶⁴ Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*. 2006 May 1;66(9):4553-7. Review. Erratum in: *Cancer Res*. 2006 Jun 15;66(12):6458.
- ¹⁶⁵ Zavadil J, Böttlinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005 Aug 29;24(37):5764-74.
- ¹⁶⁶ Guan F, Schaffer L, Handa K, Hakomori SI. Functional role of gangliosylceramide in epithelial-to-mesenchymal transition process induced by hypoxia and by TGF- β . *FASEB J*. 2010 Dec;24(12):4889-903.
- ¹⁶⁷ Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871-90.
- ¹⁶⁸ Turley EA, Veiseh M, Radisky DC, Bissell MJ. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol*. 2008 May;5(5):280-90.
- ¹⁶⁹ Hung SP, Yang MH, Tseng KF, Lee OK. Hypoxia-induced Secretion of TGF-beta 1 in Mesenchymal Stem Cell Promotes Breast Cancer Cell Progression. *Cell Transplant*. 2012 Oct 12.
- ¹⁷⁰ Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(6 Pt 2):2021-36.

-
- ¹⁷¹ Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Itoh Y, Hasegawa J, Yamabe K, Otsuki Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res.* 1996 May 1;56(9):2161-6.
- ¹⁷² Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 2003 Mar 15;97(6):1573-81.
- ¹⁷³ Le QT, Denko NC, Giaccia AJ. Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2004 Aug-Dec;23(3-4):293-310.
- ¹⁷⁴ Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012 Apr;33(4):207-14.
- ¹⁷⁵ Seeber LM, Horrée N, van der Groep P, van der Wall E, Verheijen RH, van Diest PJ. Necrosis related HIF-1alpha expression predicts prognosis in patients with endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer.* 2010 Jun 19;10:307.
- ¹⁷⁶ Coffey RN, Morrissey C, Taylor CT, Fitzpatrick JM, Watson RW. Resistance to caspase-dependent, hypoxia-induced apoptosis is not hypoxia-inducible factor-1 alpha mediated in prostate carcinoma cells. *Cancer.* 2005 Apr 1;103(7):1363-74.
- ¹⁷⁷ Dong Z, Wang JZ, Yu F, Venkatachalam MA. Apoptosis-resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role for IAP-2. *Am J Pathol.* 2003 Aug;163(2):663-71.
- ¹⁷⁸ Yan W, Chang Y, Liang X, Cardinal JS, Huang H, Thorne SH, Monga SP, Geller DA, Lotze MT, Tsung A. High-mobility group box 1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases. *Hepatology.* 2012 Jun;55(6):1863-75.

5. ARTIGO EM INGLÊS

Intermittent hypoxia enhances markers of melanoma progression in a mouse model of sleep apnea

Silvana Perini, Msc¹; Denis Martinez, MD, PhD^{1,2,3}; Carolina Caruccio Montanari⁴; Luciana Rodrigues Vieira, Msc¹; Cintia Zappe Fiori, Msc^{2,3}

¹Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil; ²Cardiology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), UFRGS; ³Graduate Program in Cardiology, UFRGS; ⁴Nursing School, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS, Brazil.

Address correspondence to: Silvana Perini

Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS, Brazil. CEP 90670-001;

Phone: +55 51 3359 8289; Fax: +55 51 3022 2282 ext23;

E-mail: silperini@gmail.com

DISCLOSURE STATEMENT

This was not an industry-supported study. The authors have reported no financial conflicts of interest.

ABSTRACT

Study Objectives: Increased melanoma growth has been reported in mice exposed to intermittent hypoxia. Proteins that characterize tumor aggressiveness have not been investigated. The study aims to verify whether intermittent hypoxia mimicking sleep apnea affects markers of melanoma tumor progression.

Design: Prospective controlled animal study.

Settings: University hospital.

Participants: Twelve C57bl/6 mice.

Interventions: Mice were exposed to intermittent or sham hypoxia. During 8 hours per day, the hypoxia group was submitted to a total of 480 cycles of 30 seconds of progressive hypoxia to a nadir FIO₂ of 8±1%, followed by 30 seconds of normoxia. One million B16F10 melanoma cells were injected subcutaneously. On the 14th day, after euthanasia, tumors were removed, fixed and stained.

Measurements and Results: Immunohistochemistry staining for Ki-67, PCNA, S100-B, HMB-45, Melan-A, TGFβ, Caspase-1 and HIF-1α was quantified by two observers using digital capture and processing in three slides from each animal for each marker. The size and weight of the tumors were similar in hypoxia and simulated experiments. Median [25-75 quartiles] percentage of positive area stained for Ki-67 was 23% [15-28] in the hypoxia group and 0.3% [0.2-1.1] the control group (P=0.02); for PCNA, the percentages were 31% [25-38] and 7% [5-18], respectively (P=0.009). The differences between the groups for the remaining markers were not significant.

Conclusions: Markers of ribosomal RNA transcription and of DNA synthesis are more expressed in tumors of mice exposed to intermittent hypoxia than of controls, indicating that sleep apnea can lead to greater tumor aggressiveness.

Keywords: Cancer, Tumor Markers, KI-67, PCNA, Tumor-Associated Antigens, Experimental Melanoma

INTRODUCTION

Intermittent hypoxia, a feature of obstructive sleep apnea (OSA)¹, is used as a model to investigate outcomes of this disease.²⁻⁵ Exposure to six hours of one episode of hypoxia per minute to an oxygen nadir of 5% augments melanoma growth⁶ and metastization.⁷ Both obesity and intermittent hypoxia affect melanoma growth, with nonadditive effect.⁸

Epidemiological data suggest connections between mortality from cancer and OSA⁹ as well as increased cancer incidence in subsets of OSA patients, probably associated with the time of hypoxia produced by the disordered breathing events.¹⁰

The various stages of tumor formation and progression can be regulated by hypoxia.¹¹⁻¹⁵ Knowledge, however, focusing specifically on intermittent hypoxia simulating sleep apnea and its molecular effects in melanoma aggressiveness is incipient.

Considering the medical and social relevance of cancer and the elevated prevalence of OSA, advancing the preliminary findings on the effects of intermittent hypoxia in tumors is justifiable. The aim of the present study was to test the hypothesis that intermittent hypoxia intensifies the expression of markers of tumor progression. In this investigation, the exposure under study was 14 days of intermittent hypoxia similar to severe OSA and the outcomes were area and intensity of the staining by immunohistochemistry melanoma markers in mice.

METHODS

Animal experiments

The protocol followed the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”¹⁶ and was approved by the Institutional Ethics Committee. Twelve two-month-old male C57Bl/6J mice, weighing between 25 and 30 grams, were used in the study, six submitted to intermittent hypoxia, and six to sham intermittent hypoxia. Except for the gas mixture, both groups of melanoma-injected mice were subjected to the same protocol.

The animals were housed under temperatures ranging between 22.5 and 24.5°C with a 12:12-hour light-dark cycle and received *ad libitum* standard mice chow (Purina-Nutripal, Porto Alegre, RS, Brazil) and water.

Intermittent Hypoxia

The intermittent hypoxia system was described in detail before.^{17,18} In brief, during 14 days, 8 hours per day, from 9 AM to 5 PM, in the lights on period, the animals were kept in the system. During 30 seconds a mixture with 92% nitrogen and 8% CO₂ was released in the hypoxia chamber. A nadir of inspired oxygen fraction of 7±1% and a peak of carbon dioxide of 6±1% were reached. Next, room air was insufflated during 30 seconds to restore normoxia. The exposure to intermittent hypoxia started on the same day as the injection of melanoma cells.

Melanoma Cells

To induce melanoma in the mouse, 1x10⁶ B16F10 cells (ATCC-CRL-6475; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were used. The cells were suspended in 150µl of phosphate buffered saline and injected subcutaneously in the left hind limb of each mouse.

Tissue sampling

The mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally during the intermittent hypoxia period. After deep anesthesia was confirmed, the tumors were dissected and fixed to be stained with hematoxylin-eosin and marked with antibodies against hypoxia inducible factor-1-alfa (HIF-1 α), transforming growth factor beta (TGF- β), S100 beta protein (S100-B), melanoma antigen (Melan-A), human melanoma black-45 (HMB-45), caspase-1, antigen Ki-67, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Hematoxylin-eosin and Immunohistochemistry

The paraffin blocks of the tumor, were sectioned in 5 μ m slices. Sections were mounted on glass slides and stained with hematoxylin-eosin. The immunohistochemical staining was processed using monoclonal antibodies against HIF-1 α (1:200 dilution; sc-53546), TGF- β (1:200 dilution; sc-398), S100-B (1:400 dilution; sc-28533), Melan-A (1:200 dilution; sc-20032), Caspase-1 (1:200 dilution; sc-56036) all Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; HMB-45 (1:100 dilution; HMB-45; Dako, Carpinteria, CA, USA), Ki-67 (1:50 dilution; SP6; Cell Marque, Rocklin CA, USA) and PCNA (1:200 dilution; 307901; BioLegend, San Diego, CA, USA).

The secondary antibody was PicTure™-MAX Polymer Detection kit, 87-8983 (Invitrogen, Camarillo, CA, USA). The color was developed with a DAB chromogen. Sections were counterstained with hematoxylin-Harris and rinsed with ammoniacal water to obtain a light blue color.

Three pictures of each slide at 400X were quantified for immunohistochemistry, utilizing image processing with Adobe Photoshop™, using selection tools and readers of digital optical density. Intensity of a gray-scale from 0 (black) to 250 (white) was obtained through the “pixel intensity/pixel area” value in arbitrary units (AU).¹⁹

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (v17.0; SPSS, Chicago, IL). Medians and quartiles [25th-75th] were utilized to express grouped data. Mann-Whitney test was used to compare measurements of optical density and percentage of stained area. Results were considered significant when probability of alpha error was <0.05 .

RESULTS

The tumor diameter in the sham and hypoxia groups, respectively 6[4-13 mm] vs. 9[6-11mm] ($P = 0.6$) and the number of mitoses by 400x field, respectively 18[17-22] vs. 18[16-22] ($P = 0.8$), were similar. No macroscopic evidence of metastasis was encountered in brain and lungs.

Figure 1 contains the complete results for all markers. Significant differences were seen between percentage area of Ki-67-positive staining (hypoxia group, 23% [15-28%] vs. sham group 0.3% [0.2-1.1%]), percentage area of PCNA-positive staining (31% [25-38] vs. 7% [5-18]), and density of Ki-67-positive staining (270 AU [64-74] vs. 125 AU [123-126]). The remaining differences were either borderline or non-significant.

DISCUSSION

Our results indicate that a model of OSA increases the aggressiveness of melanoma. The tumors from the intermittent hypoxia group can be considered of higher grade than the ones from the control group. Potential mechanisms involved in the already reported enhancement of cancer progression by intermittent hypoxia were identified. Increased expression of Ki-67 and PCNA indicates that RNA- and DNA-mediated processes are

triggered by intermittent hypoxia. The results support a malignancy-enhancing effect of apnea-simile hypoxia.

We were unable to confirm previous reports of larger tumor size in the hypoxia than in the sham group. One reason for this may be the duration of the experiment shorter than those previously used.^{7,8} It is possible that allowing a few more days would capture the fully manifested difference in exponential growth, heightening the difference in size and the recognition of macroscopic metastization. The experiment was interrupted at 14 days, in part, to avoid suffering of the mice. Although all animals were injected with the same number of cells, the initial seeding of each tumor may derive from implants of different sizes. Additionally, cell lysis during injection may trigger inflammatory/immune responses that would hinder the tumor growth.

Presence and absence of correlation between Ki-67 and tumor size have been reported.^{20,21} The small numbers here utilized do not allow further speculation on the reasons for these discrepancies.

Melanoma was chosen as an appropriate cancer model to test the present hypothesis. More than 430 hypoxia-responsive genes have been identified in the B16F10 murine melanoma cell line, *in vitro*.²²

The fact that the HIF-1 α was less expressed in the hypoxia group, although not significantly different, needs to be interpreted. Environmental hypoxia is fully manifested in the blood in seconds. However, as tissue perfusion is lessened, the oscillation tissue PO₂ becomes less evident.²³ Because the perfusion inside a tumor is uneven, the troughs of cage oxygen during the experiment may be reflected in an attenuated fashion in the less perfused areas. Besides, the hypoxia signaling via HIF-1 α is already activated in tumors,²⁴ not being furthered by a weakened intermittent hypoxia signal. It is, therefore, plausible to consider that

no additional increase in HIF-1 α is noticeable under intermittent hypoxia when compared to an already hypoxic control melanoma.

In conclusion, the greater expression of markers of ribosomal RNA transcription (Ki-67) and of DNA synthesis (PCNA) in tumors of mice exposed to intermittent hypoxia than of controls provide molecular evidence of greater tumor aggressiveness with potential repercussion in the clinical course of neoplasias in sleep apnea patients. Further investigation is necessary to confirm these preliminary results.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by CNPq and FINE-HCPA (Brazil).

5.1 TABELA E FIGURAS DO ARTIGO

FIGURE LEGEND

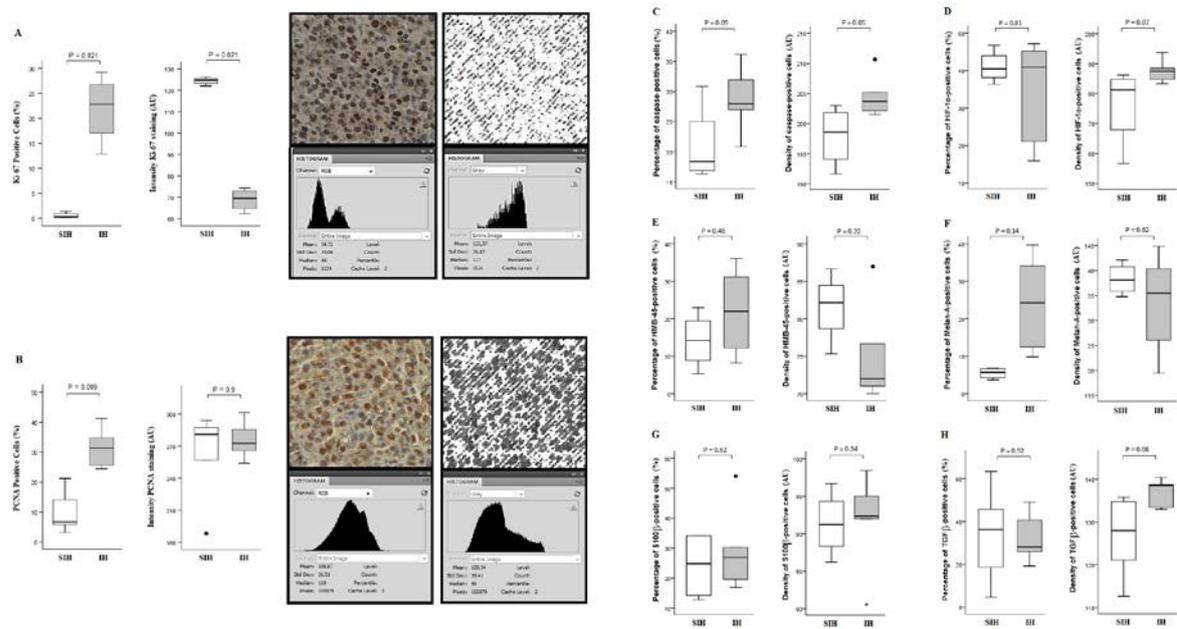


Figure 1. Immunohistochemistry slide, digital analyses of staining, and box-plots representing the percentage of area stained positive and intensity of staining, in sham (SH) and intermittent hypoxia (IH) groups, of the markers (A) Ki-67 (B) PCNA. Box-plots representing the percentage of area stained positive and intensity of staining of markers: (C) caspase-1, (D) hypoxia inducible factor-1-alfa (HIF-1 α), (E) human melanoma black-45 (HMB-45), (F) melanoma antigen (Melan-A), (G) S100 beta protein (S100- β), (H) transforming growth factor beta (TGF- β). AU: arbitrary units.

REFERENCES

- ¹ Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 2010;90:47-112.
- ² Veasey SC, Davis CW, Fenik P, Zhan G, Hsu YJ, Pratico D, Gow A. Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions. *Sleep* 2004;27:194-201.
3. Decker MJ, Jones KA, Solomon IG, Keating GL, Rye DB. Reduced extracellular dopamine and increased responsiveness to novelty: neurochemical and behavioral sequelae of intermittent hypoxia. *Sleep* 2005;28:169-76.
4. Sanfilippo-Cohn B, Lai S, Zhan G, Fenik P, Pratico D, Mazza E, Veasey SC. Sex differences in susceptibility to oxidative injury and sleepiness from intermittent hypoxia. *Sleep* 2006;29:152-9.
5. Almendros I, Farré R, Planas AM, Torres M, Bonsignore MR, Navajas D, Montserrat JM. Tissue oxygenation in brain, muscle, and fat in a rat model of sleep apnea: differential effect of obstructive apneas and intermittent hypoxia. *Sleep* 2011;34:1127-33.
6. Almendros I, Montserrat JM, Ramírez J, Torres M, Duran-Cantolla J, Navajas D, Farré R. Intermittent hypoxia enhances cancer progression in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Respir J* 2012;39:215-7.
7. Almendros I, Montserrat JM, Torres M, et al. Intermittent Hypoxia Increases Melanoma Metastasis To The Lung In A Mouse Model Of Sleep Apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 2013. [Epub ahead of print]
8. Almendros I, Montserrat JM, Torres M, Bonsignore MR, Chimenti L, Navajas D, Farré R. Obesity and intermittent hypoxia increase tumor growth in a mouse model of sleep apnea. *Sleep Med* 2012;13:1254-60.

-
9. Nieto FJ, Peppard PE, Young T, Finn L, Hla KM, Farré R. Sleep-disordered breathing and cancer mortality: results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:190-4.
 10. Campos-Rodriguez F, Martinez-Garcia MA, Martinez M, et al; on behalf of the Spanish Sleep Network. Association between Obstructive Sleep Apnea and Cancer Incidence in a Large Multicenter Spanish Cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:99-105.
 11. Toffoli S, Roegiers A, Feron O, et al. Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis* 2009;12:47-67.
 12. Toffoli S, Michiels C. Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *FEBS J* 2008;275:2991-3002.
 13. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2008;15:678-85.
 14. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998;394:485-90.
 15. Rofstad EK, Gaustad JV, Egeland TA, Mathiesen B, Galappathi K. Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *Int J Cancer* 2010;127:1535-46.
 16. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
 17. Martinez D, Fiori CZ, Baronio D, et al. Brown adipose tissue: is it affected by intermittent hypoxia? *Lipids Health Dis* 2010;9:121.
 18. Martinez D, Vasconcellos LF, de Oliveira PG, Konrad SP. Weight loss and brown adipose tissue reduction in rat model of sleep apnea. *Lipids Health Dis*. 2008;7:26.

-
19. Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G, Gown AM. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 1997;45:1559-65.
 20. Karlsson M, Boeryd B, Carstensen J, et al. Correlations of Ki-67 and PCNA to DNA ploidy, S-phase fraction and survival in uveal melanoma. *Eur J Cancer* 1996; 32A:357-62.
 21. Mooy CM, de Jong PT, Van der Kwast TH, Mulder PG, Jager MJ, Ruiter DJ. Ki-67 immunostaining in uveal melanoma. The effect of pre-enucleation radiotherapy. *Ophthalmology* 1990;97:1275-80.
 22. Olbryt M, Habryka A, Tyszkiewicz T, et al. Melanoma-associated genes, MXI1, FN1, and NME1, are hypoxia responsive in murine and human melanoma cells. *Melanoma Res* 2011; 21:417-25.
 23. Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin MK, Polotsky VY. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol* 2011; 111:881-90.
 24. Kuphal S, Winklmeier A, Warnecke C, Bosserhoff AK. Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma. *Eur J Cancer* 2010;46:1159-69.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com nossos objetivos, os achados sinalizam que:

- A apneia do sono simulada na hipóxia intermitente pode levar a uma maior agressividade de tumores sólidos, visto o aumento de células coradas positivamente pelos biomarcadores Ki-67 e PCNA por imunohistoquímica.

- O aumento da expressão do biomarcador Caspase-1 é uma característica de má perfusão do tecido exposto à hipóxia intermitente.

- A hipóxia intermitente não teve efeito sobre os biomarcadores S100-B, HMB-45, Melan-A, TGF- β , e HIF-1 α .