

MiRNAs COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE NEFROTOXICIDADE INDUZIDA PELA CISPLATINA EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.

Palavras-Chave: miRNAs, BIOMARCADORES, CISPLATINA, NEFROTOXICIDADE

Autores:

Juliana M. Oliveira, Julia C. F. Quintanilha, Maria A. Cursino, Jessica B. Borges, Nadine G. Torso, Larissa B. Bastos, Thiago S. Cobaxo, Eder C. Pincinato, Mario H. Hirata, Murilo V. Geraldo, Carmen S. P. Lima - UNICAMP
Prof.^a Dr.^a PATRICIA MORIEL (orientadora) - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O câncer de cabeça e pescoço é um termo utilizado para representar tumores identificados nas vias aerodigestivas superiores como cavidade oral, faringe, laringe, seios paranasais, fossa nasal, glândulas salivares e tireoide (Mendenhall et al., 2005). No ano de 2018, estimou-se no Brasil, 11.200 casos novos de câncer de cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres. Em relação ao câncer de laringe, estimou-se 6.390 casos novos em homens e 1.280 em mulheres (INCA, 2018). A escolha do tratamento baseia-se principalmente em parâmetros clínicos, radiológicos e histopatológicos, os quais consistem no local do tumor primário e no sistema de estadiamento TNM. A depender das condições, o tratamento pode ser realizado através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Pode-se ainda associar esses métodos em diferentes combinações. O regime mais utilizado consiste em altas doses de cisplatina (100 mg/m² a cada 21 dias) concomitante à radioterapia e a quimiorradiação é considerada insegura pelo alto risco de grave toxicidade (Adelstein et al., 2003). Apesar da cisplatina ser um agente de alto potencial antineoplásico com farmacocinética favorável, seu uso é limitado devido a toxicidades importantes destacando-se mielotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, ototoxicidade, hepatotoxicidade e sua principal toxicidade, a renal (Whiteman, 2004).

Os miRNAs são caracterizados como pequenas moléculas de RNA, não codificadores de proteína, que desempenham importante função na regulação pós-transcricional da expressão gênica (Lagos-Quintana, et al., 2001). Sabe-se que algumas condições fisiopatológicas como inflamação, estresse oxidativo, diabetes e vários tipos de câncer incluindo o câncer de cabeça e pescoço (Lu et al., 2008), estão relacionadas com alterações no espectro de miRNAs.

Os biomarcadores mais utilizados para avaliar a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina são a creatinina sérica e a ureia, porém eles podem ser influenciados por vários processos fisiológicos, como síntese e degradação de proteínas e desidratação (Mendenhall et al., 2005). Assim, existe a necessidade da pesquisa de novos biomarcadores para danos renais induzidos pela cisplatina, já que os marcadores tradicionais são geralmente pouco sensíveis, pois se mostram alterados apenas depois da lesão no rim já estar extensa, e inespecíficos, uma vez que vários outros processos fisiológicos podem alterar seus níveis basais. Essa falta de sensibilidade e especificidade pode gerar resultados falsos positivos ou falsos negativos, levando a conclusões falsas ou ainda na detecção tardia da lesão renal (Herrera-Pérez et al., 2016). Entre os biomarcadores para lesão renal estudados nos últimos anos, os miRNAs são considerados uns dos

mais promissores, uma vez que são altamente conservados entre as diferentes espécies e altamente estáveis nos fluidos biológicos.

Este projeto teve como objetivo principal validar miRNAs identificados por sequenciamento como possíveis biomarcadores de nefrotoxicidade induzida por cisplatina em 50 pacientes com câncer de cabeça e pescoço previamente incluídos. Os objetivos específicos são: a) Validar a expressão dos principais miRNAs plasmáticos relacionados à nefrotoxicidade induzidas pela cisplatina após o primeiro ciclo de quimioterapia; b) Correlacionar a expressão dos principais miRNAs relacionados à nefrotoxicidade com as demais toxicidades. Trata-se de um estudo observacional, prospectivo, quantitativo, cuja amostragem foi não probabilística do tipo consecutiva. Os pacientes incluídos possuem diagnóstico de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tratados com o antineoplásico cisplatina (80-100mg/m² a cada 21 dias, por 3 ciclos, sendo considerado para este estudo apenas o 1º ciclo) concomitante a radioterapia.

METODOLOGIA:

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP (CAAE: 65397517.7.0000.5404). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado por todos os pacientes do estudo antes da coleta de qualquer dado ou amostra.

I) Caracterização dos pacientes: Os pacientes foram caracterizados através de dados obtidos por entrevistas no dia do caso novo e nos dias em que eles retornavam ao hospital para exames ou consultas de retorno, dos prontuários médicos e da discussão do caso realizada com a equipe médica.

II) Avaliação das toxicidades: Amostras de sangue foram coletadas de todos os pacientes para avaliação dos parâmetros de toxicidade antes, 5 dias (D5) e 20 dias (D20) após o primeiro ciclo de quimioterapia com cisplatina.

II) Coleta e separação de amostras para os experimentos laboratoriais: Foram coletados dois tubos de 4 mL de sangue contendo EDTA como anticoagulante no basal e no D5. O sangue coletado foi centrifugado a 2.500 rpm, 4°C por 10 minutos, o plasma foi aliquoteado e armazenado em freezer -80°C até a realização dos experimentos.

IV) Extração dos miRNAs: Para realização do sequenciamento dos miRNAs expressos foram extraídos os miRNAs de amostras de plasma de 6 pacientes que apresentaram nefrotoxicidade (grau de aumento de creatinina sérica ≥ 2 no D5) e de 6 pacientes que não apresentaram nefrotoxicidade (grau de aumento de creatinina sérica = 0 no D5). Após identificação dos miRNAs a serem validados, foram extraídos miRNAs de amostras de plasma basais e D5 de todos os pacientes incluídos nas análises de miRNA. As extrações dos miRNAs para sequenciamento e validação foram realizadas utilizando o miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Cat No./ID: 217184).

V) Sequenciamento dos miRNAs: A montagem das bibliotecas de miRNAs foi realizada utilizando o QIAseq™ miRNA Library Kit (Qiagen, Cat No./ID: 331502) e o sequenciamento em si foi realizado utilizando o MiSeq Reagent Kit v3, 150-cycle (Illumina, MS-102-3001).

VI) Validação dos miRNAs selecionados: Foram selecionados 3 miRNAs diferentemente expressos que apresentaram um FR $>5,0$ ou FR $<-5,0$ e p valor $<0,05$. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Cat No./ID: A28007) e a qPCR utilizando o TaqMan™ Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, Cat No./ID:A25576). A análise dos miRNAs foi feita através do QuantStudio™ Real Time PCR Software 6.

VII) Análises estatísticas: As frequências dos dados clínicos/demográficos e dos graus de toxicidade são apresentadas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) e medidas descritivas (média, desvio padrão). Os parâmetros de toxicidade foram comparados no tempo com uso de teste de Friedman. As expressões de miRNAs na etapa de validação foram comparadas entre os grupos caso e controle nos tempos basal, D2 e D5 através do teste de Mann-Whitney e para as comparações com p valor $<0,10$ foram produzidas curvas Receiver Operating Characteristic (ROC). O nível de significância adotado para o estudo foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

I) Caracterização dos pacientes: A maioria dos pacientes incluídos na pesquisa são homens (92%) com idade média de $59,08 \pm 7,19$ anos, tendo uma predominância de brancos. A renda familiar média foi de $0,96 \pm 0,73$ salários-mínimos. Uma porcentagem de 14% deles estavam desempregados, 18,0% afastados por causa da doença, 19,0% aposentados e apenas 5% empregados. Em relação a escolaridade, os pacientes apresentaram uma média de $5,50 \pm 4,21$ anos de estudo, sendo que a maioria deles não completou o ensino fundamental (62,0%). A maioria eram casados (31%). Além disso, 38% dos pacientes eram tabagistas acentuados e 39% eram ao menos etilistas acentuados. O índice de massa corpórea teve uma média de $22,40 \pm 4,76$ Kg/m². Um total de 16% estava com traqueostomia e apenas 6% deles usavam sonda juntamente com a traqueostomia. A maior parte dos pacientes apresentaram KPS de 90% (66%). Em relação a localização do câncer, 46% apresentavam na cavidade oral, seguido de orofaringe (22%), sendo a maioria moderadamente diferenciado (66%) e pouco diferenciado (14%). Pelo sistema TNM, a maioria dos pacientes foram classificados com T4 (50%) e N2 (58%). Quase todos eles tinham estadios IV (78%). Alguns deles possuíam hipertensão arterial sistêmica (22%) e diabetes melito (12%). Em relação aos tumores, pode-se observar a prevalência de localização na cavidade oral. Esse resultado distoa de trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, no qual observamos principalmente tumores de faringe, no entanto, outros autores também já observaram maior prevalência de tumores na cavidade oral (Visacri et al, 2017; Quintanilha et al 2018; Alvarenga et al, 2012).

Em relação aos exames clínicos, houve redução dos principais parâmetros hematológicos após o primeiro ciclo de tratamento com cisplatina, especialmente no vigésimo dia. Observamos ainda, que houve um aumento da creatinina sérica e redução do clearance, principalmente no quinto dia após o início do tratamento (D5). Os principais marcadores hepáticos também sofreram alterações no D5.

II) Reações adversas: Durante esse período, houve predomínio de grau 2 para náusea e grau 0 tanto para vômito quanto para diarreia. Todos os demais graus de toxicidade foram estudados antes do tratamento, cinco e vinte dias após o início do tratamento. Para as toxicidades hematológicas, observamos que houve predomínio de grau 1 para anemia, grau 3 para linfopenia e grau 0 para leucopenia, neutropenia e plaquetas. Já para as renais, conseguimos observar que houve predomínio do grau 0 para o aumento de creatinina sérica e de grau 2 para a redução do clearance de creatinina. Os demais parâmetros resultaram predomínio em grau 0. Em relação aos graus de toxicidade hepáticos, houve predomínio de grau 0 para todos os parâmetros analisados.

Conforme o esperado, a nefrotoxicidade foi evidenciada com alteração significativa dos parâmetros avaliados após a quimioterapia apesar do aumento de creatinina sérica, considerada um dos padrões ouro para avaliação de nefrotoxicidade, ter apresentado grau 0. Isso pode ser justificado pela administração de manitol e hidratação vigorosa concomitante a administração da cisplatina, o que contribui para a profilaxia de nefrotoxicidade e para a baixa incidência de graus mais elevados de aumento de creatinina sérica (Morgan et al., 2012).

III) Aquisição dos primers de interesse: Os valores de creatinina sérica e clearance de creatinina dos pacientes utilizados para a montagem de biblioteca podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de creatinina sérica e clearance de creatinina dos pacientes utilizados para montagem de bibliotecas de microRNAs (média \pm desvio padrão).

| | Creatinina sérica (mg/dL) | |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------|
| | Basal | D5 |
| Pacientes controle | $0,94 \pm 0,18$ | $0,94 \pm 0,21$ |
| Pacientes com nefrotoxicidade | $0,72 \pm 0,10$ | $3,39 \pm 2,13$ |

| | Clearance de creatinina (mL/min) | |
|-------------------------------|----------------------------------|---------------|
| | Basal | D5 |
| Pacientes controle | 70,20 ± 22,93 | 69,72 ± 24,01 |
| Pacientes com nefrotoxicidade | 97,62 ± 40,55 | 25,05 ± 11,46 |

Após sequenciamento e normalização, 22 miRNAs estavam significativamente diferentemente expressos com um fold change (FC) >2.0. Para posterior validação nos demais pacientes incluídos na pesquisa, foram selecionados apenas aqueles miRNAs diferentemente expressos com um FC >5.0. A seguir, na Tabela 2, temos os miRNAs selecionados para a validação com seus respectivos FC e valores de p.

Tabela 2. MicroRNAs plasmáticos e urinários selecionados para validação.

| Plasma | | |
|----------|------------------|------------|
| miRNA | Fold change (FC) | Valor de p |
| miR-3168 | 8,08 | 1,98e-8 |
| miR-6125 | 5,31 | 6,60e-5 |
| miR-4718 | 5,12 | 4,24e-5 |

IV) Validação dos miRNAs selecionados: Após a extração dos miRNAs, foi realizada a síntese de cDNA e a qPCR. Além dos miRNAs selecionados para validação, também foi realizada a qPCR do controle exógeno cel-miR-39 e do controle endógeno hsa-miR-16 para normalização. Devido a menor variação de CTs para o cel-miR-39, optamos por normalizar nossas análises com este controle exógeno. Foi verificado o perfil dos miRNAs plasmáticos miR-3168, miR-6125 e miR-4718 por qPCR. No entanto, alguns pacientes foram excluídos por apresentarem expressão do cel-miR-39 >2DP. Portanto, foram analisados 43, 50 e 48 pacientes para os miR- 3168, miR-6125 e miR-4718, respectivamente. A Figura 1 mostram a expressão destes miRNAs plasmáticos antes e 5 dias após o primeiro ciclo de quimioterapia com cisplatina nos grupos controle e caso.

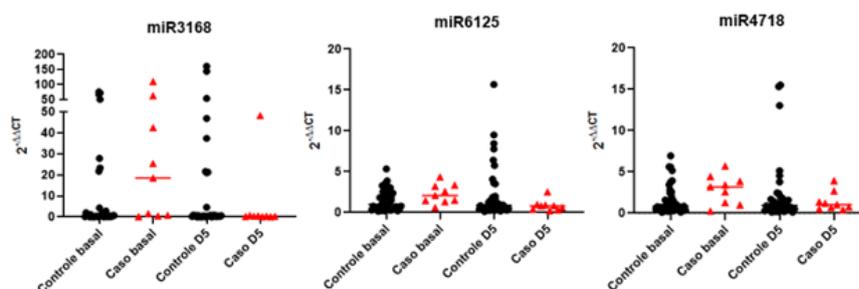


Figura 1. Expressão dos miRNAs antes e 5 dias após o primeiro ciclo de quimioterapia com cisplatina.

É possível observar que os três miRNAs apresentaram tendência de estarem mais expressos no grupo caso antes da quimioterapia. No entanto, após o início do tratamento, todos os miRNAs avaliados mostraram não estar significativamente mais expressos no grupo caso que no controle. Para a variação percentual, foi observado que houve uma variação menor para os miR- 3168 e miR-6125 após o tratamento, que provavelmente ocorre pelo fato destes miRNAs já estarem mais expressos no grupo caso antes da quimioterapia.

CONCLUSÕES:

Nosso trabalho demonstra que os pacientes com câncer de cabeça e pescoço em tratamento com altas doses de cisplatina são geralmente do sexo masculino, com idade média de 59,08 anos, aposentados, com menos de 8 anos de estudo, casados, não elegíveis para realização da ressecção cirúrgica antes da quimioterapia, etilistas e tabagistas acentuados, com KPS de 90%, tumores localizados na cavidade oral, moderadamente diferenciados, graduados como T4N2, estadio 4 e que não possuem outras comorbidades.

Os pacientes apresentaram alta prevalência de toxicidades, com alteração estatisticamente significativa de praticamente todos os parâmetros após a quimioterapia com cisplatina. Dentre as toxicidades avaliadas, destacamos a alta prevalência de graus acima de 0 para diminuição do clearance de creatinina, hiponatremia, náusea, anemia, leucopenia e linfopenia.

O sequenciamento de miRNAs de pacientes com e sem nefrotoxicidade identificou diversos miRNAs plasmáticos e urinários diferentemente expressos entre esses pacientes. Os miR-3168, miR-6125 e miR-4718 apresentaram uma tendência a estarem mais expressos no grupo caso do que no grupo controle antes da quimioterapia com cisplatina, sendo que o miR-4718 apresentou $p=0,05$.

BIBLIOGRAFIA:

- Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Wagner Jr H, Kish JA, Ensley JF, et al. **An Intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer.** J Clin Oncol. 2003; 21(1):92-8.
- Herrera-Peréz Z, Gretz N, Dweep H. **A comprehensive review on the genetic regulation of cisplatin-induced nephrotoxicity.** Curr Genomics. 2016; 17:279-293.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: **Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro:Inca, 2018. 53p. 99-100p.
- Jindal SK, Malik SK, Dhand R, Gujral JS, Malik AK, Datta BN. Bronchogenic carcinoma in Northern India. Thorax. 1982; 37(5):343-7.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschli T. **Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.** Science 2001; 294:853-8.
- Lu Z, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. **MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene.** Oncogene. 2008; 27(31):4373-9.
- Mendenhall WM, Rigs CE, Cassisi NJ. **Treatment of head and neck cancers.** In: De Vita VT, Hellman, S, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- Morgan KP, Buie LW, Savage SW. **The Role of Mannitol as a Nephroprotectant in Patients Receiving Cisplatin Therapy.** Ann Pharmacother 2012;46:276-281.
- Quintanilha JCF, de Sousa VM, Visacri MB, Amaral LS, Santos RMM, Zambrano T, Salazar LA, Moriel P. **Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity.** Medline 2017.
- U.S Department of Health and Human Services. **Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE).** U.S Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute, (2010) Version 4.0.
- Visacri MB, Pincinato EDC, Ferrari GB, Quintanilha JCF, Mazzola PG, Lima CSP, et al. **Adverse drug reactions and kinetics of cisplatin excretion in urine of patients undergoing cisplatin chemotherapy and radiotherapy for head and neck cancer: A prospective study.** DARU, J Pharm Sci 2017;25:12.