



Desregulação de miR-199a-3p, miR-199a-5p, e miR-148a-3p levando à transição epitelial-mesenquimal e falha na adesão celular em tumores metastáticos da tireoide: um estudo computacional

Palavras-Chave: metástase, câncer de tireoide, biomarcadores

Autores/as:

MATEUS LEANDRO BEZERRA [FCM / UNICAMP]

KARINA COLOMBERA PERES [FCM / UNICAMP]

LARISSA TEODORO [FCM / UNICAMP]

MURILO VIERA GERALDO [IB / UNICAMP]

NATÁSSIA ELENA BUFALO [FCM / UNICAMP]

Prof^a Dr^a LAURA STERIAN WARD (orientador/a) [FCM / UNICAMP]

Introdução

O câncer de tireoide (CT) é a neoplasia endócrina mais comum e sua incidência vem aumentando significativamente nas últimas décadas (1), dos quais, dentre o CT, o câncer de tireoide papilífero (CPT) é o mais comum. Embora os pacientes com CPT apresentem um bom prognóstico, uma pequena proporção deles evolui para metástase linfonodal (ML) regional ou comportamento agressivo do tumor, como invasão local, metástase à distância e ML cervical - todos eles correlacionados com pior prognóstico (2) e recorrência (3). Outro CT de grande importância clínica é o câncer medular de tireoide (CMT); este representa 3-12% de todos os tumores tireoidianos malignos, sendo a maioria na forma esporádica. Sessenta por cento dos pacientes com tumores < 2 cm terão envolvimento de linfonodos cervicais, onde o procedimento cirúrgico pode ser a melhor chance de sobrevivência e palição a longo prazo (4). A identificação de tumores com potencial para pior progressão é, portanto, uma preocupação contínua dentro do CT.

O uso de ferramentas bioinformáticas tem sido amplamente empregado para a busca de biomarcadores moleculares com propósitos diagnósticos e prognósticos, principalmente com foco em assinaturas de expressão gênica e painéis de mutações (5). Recentemente, pesquisadores têm demonstrado um interesse crescente em microRNAs (miRNA) como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico. Estes pequenos RNAs não-codificadores estão relacionados à patogênese e progressão de diferentes tipos de tumores. De acordo com os papéis de seus genes alvo, os miRNAs também podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais (6). Aqui, empregamos várias dessas ferramentas para identificar possíveis miRNAs envolvidos na ocorrência de ML em pacientes com CT.

Partindo do pressuposto de que os mesmos miRNAs podem regular as mesmas vias em distintos carcinomas, como bem elucidado por Niveditha et. al. (7) ao comparar os miRNAs diferentemente expressos em 7 tumores distintos, nosso objetivo neste trabalho foi investigar miRNAs desregulados na ML em dois diferentes tipos histológicos de CT onde em um (CMT) a presença de ML é sabidamente um indicativo de pior prognóstico e outro (CPT) apresenta dados ainda conflitantes.

Materiais e métodos

Dados de Expressão de miRNAs

Procuramos por "*miRNA AND Thyroid carcinoma*" no *Gene Expression Omnibus* (GEO) (8). Dois dados de experimentos com ML [GSE104006 (9) e GSE97070 (10)] se apresentam adequados para análise no GEO2R, um software de análise estatística de dados do GEO, e foram selecionados para busca de miRNAs diferentemente expressos (MDE) em amostras de CPT ML, CMT ML e seus respectivos controles saudáveis.

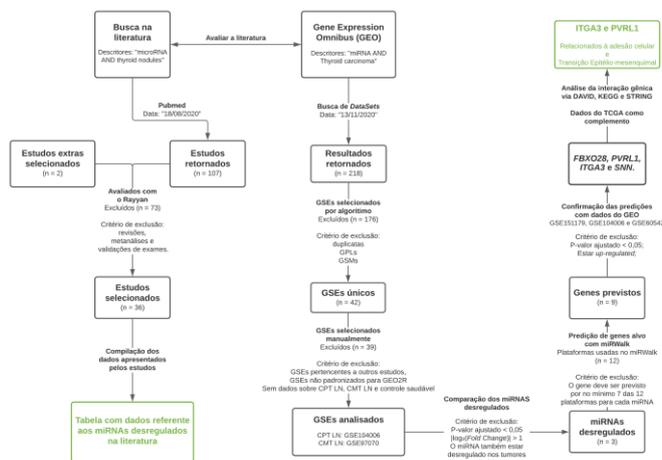


Figura 1: Organograma do trabalho

plataformas devem prever o gene como alvo de cada um dos miRNAs.

Tabela 1. Número de amostras por tipo histológico nos dados de expressão miRNA.

Estudo	CPT	CPT ML	Normal 1	CPT+PDTC	PDTC	CMT ML	CMT	Normal 2
GSE104006 (2)	20	2	6	2	4			
GSE97070 (3)						9	8	3

Nota: Normal1 - tecido normal da tireoide, Normal2 - tecido de paratireoide normal, CPT+PDTC amostra com carcinoma papilífero da tireoide e carcinoma da tireoide pouco diferenciado, PDTC carcinoma da tireoide pouco diferenciado.

Dados de Expressão Genômica

Para os dados genômicos do CPT ML, procuramos no GEO por "*papillary thyroid carcinoma [All Fields] AND ("neoplasm metastasis" [MeSH Terms] OR metastasis [All Fields])*" e "*("neoplasm metastasis" [MeSH Terms] OR metastasis [All Fields]) AND PTC [All Fields]*" que retornaram 40 resultados. Desses, 3 estudos foram selecionados como mais adequados: GSE151179 (12), GSE104006 (9) e GSE60542 (13).

Tabela 2. Número de amostras por tipo histológico em dados de expressões genômicas.

Estudo	CPT	CPT ML	Normal	NLN	PM	CPT+PDTC	PDTC
GSE151179 (4)	17	17	13				
GSE60542 (5)	33	23	30	4	1		
GSE104006 (2)	20	2	6			2	4

Nota: NLN linfonodal normal, PM metástase pleural.

Em relação aos dados genômicos do CMT ML procuramos no GEO por "*MTC [All Fields] AND ("neoplasm metastasis" [MeSH Terms] OR metastasis [All Fields])*" na mesma data, o que nos retornou 2 resultados, dos quais nenhum deles com dados de controle saudáveis disponíveis, portanto excluídos da análise.

Com o GEO2R analisamos os genes diferentemente expressos (GDE) comparando CPT ML com o controle não neoplásico. Utilizamos um valor de p ajustado < 0,05 como corte (pelo método de Benjamini & Hochberg). Genes desregulados negativamente foram excluídos pois tendo em vista a correlação inversamente proporcional entre miRNAs e seus genes alvo, estes devem estar desregulados positivamente.

O corte estabelecido foi um p-valor ajustado < 0,05 (pelo método Benjamini & Hochberg) e $|\log_2(\text{fold change})| > 1$. Consideramos como critérios de exclusão miRNAs que também foram desregulados no tumor primário (em relação ao controle saudável).

Utilizamos o miRWalk 2.0 (11) para prever as interações com os alvos dos miRNAs. Pesquisamos nos 12 bancos de dados disponíveis pelos genes alvo de cada MDE de nosso estudo. A fim de aumentar a confiabilidade, estabelecemos que pelo menos 7 de 12

Utilizamos a ferramenta de anotação funcional do *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) v6.8 (14) para descobrir os processos biológicos relacionados a estes genes; *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (15) para descobrir os caminhos nos quais estes genes participam e finalmente a STRING: *functional protein association network* para mostrar as interações entre o gene alvo e suas proteínas correlatas, como um complemento a ambas as ferramentas.

Finalmente, para complementar a análise realizada, utilizamos dados do TCGA baixados pelo cBioportal referentes a 500 amostras que apresentavam dados de *RNA-seq*, cruzando com informações clínicas para encontrar padrões no prognóstico dos pacientes.

Resultados

Quarenta e oito miRNAs foram encontrados desregulados nas amostras de CPT ML em comparação com o controle saudável em GSE104006 (9), e 236 miRNAs desregulados nas amostras de CMT ML em comparação com o controle saudável em GSE97070 (10). Desses, 14 miRNAs estavam comumente desregulados em ambos os tipos histológicos, mas apenas 3 não estavam desregulados em comparação ao respectivo tumor primário. O *fold change*, p-valor e p-valor ajustado desses 3 miRNAs (hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-148a-5p) estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. MiRNAs desregulados

miRNA	CPT ML			CMT ML		
	\log_2 (fold change)	P-valor	P valor ajustado	\log_2 (fold change)	P-valor	P valor ajustado
<i>miR-199a-3p</i>	-2.18590	0.000005	0.000785	-1.238755	0.00155	0.0260
<i>miR-148a-3p</i>	-2.26743	0.000028	0.002838	-1.693896	0.00555	0.0492
<i>miR-199a-5p</i>	-1.24834	0.000152	0.008906	-0.971227	0.00195	0.0302

Usando miRWalk 2.0 (11) procuramos por genes alvo potenciais para estes 3 MDE, e encontramos 9 genes preditos: *SNN*, *PVRL1*, *FBXO28*, *ITGA3*, *FXR1*, *RC3H1*, *ANKRD52*, *VANGL1* e *LCOR*. A fim de confirmar esta potencial relação mRNA-miRNA, pesquisamos dados genômicos de tireoide e confirmamos positivamente a desregulação dos genes *ITGA3*, *PVRL1* (também chamados *NECTIN1*), *SNN* e *FBXO28* nos CT ML quando comparados aos tecidos normais, como descrito na Tabela 4, reforçando-os como possíveis genes alvo de miRNAs selecionados.

Tabela 4. \log_2 (fold change), p-valor e p-valor ajustado de genes previstos no carcinoma da tireoide com metástase linfonodal em comparação com o tecido normal.

Gene	\log_2 (fold change)	P-valor	P-valor ajustado
<i>SNN</i> ^a	0.312786	0.000645	0.004580
<i>PVRL1</i> ^{b, c}	0.898478	0.000008	0.000290
	1.10	0.000513	0.016069
<i>FBXO28</i> ^{a, b}	0.237112	0.003540	0.025300
	0.290343	0.000123	0.001160
<i>ITGA3</i> ^c	1.31	0.002300	0.038743
<i>FXR1</i> ^b	-0.509844	0.000451	0.005630
<i>RC3H1</i> ^a	-0.348581	0.000022	0.000281
<i>VANGL1</i> ^a	-0.821988	0.000004	0.000168

Nota: ^a GSE60542, ^b GSE151179, e ^c GSE104006.

Com *DAVID* (14) procuramos processos biológicos que pudessem estar relacionados a estes genes, obtendo resultados apenas para os genes *ITGA3* e *PVRL1*. De acordo com essa ferramenta, estes genes estão relacionados à adesão celular e à atividade de heterodimerização da proteína. Também procuramos informações no KEGG (15) e descobrimos que *PVRL1* está de fato envolvido nas vias de adesão celular, além de participar das juntas de adesão celular e na infecção pelo vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Quanto ao *ITGA3*, os dados do KEGG mostram que este gene está relacionado a várias vias, como sinalização PI3K-Akt [que medeia os efeitos biológicos da leptina (16)], adesão focal, matriz extracelular e interação receptora, regulação do citoesqueleto de actina, via de infecção pelo papiloma humano (HPV) e vias relacionadas ao câncer. A rede de associação funcional de proteínas STRING produziu resultados semelhantes sistema DAVID.

Discussão

Este estudo visa contribuir explorando possíveis miRNAs envolvidos no processo metastático do câncer de tireoide. Usando a bioinformática, conseguimos identificar 3 miRNAs e 4 genes relacionados com metástases linfonodais em dois tipos diferentes de câncer de tireoide.

Vale notar que o miR-199a-3p e o miR-199a-5p já foram anteriormente correlacionados a pior prognóstico de tumores da tireoide (17,18) e o miR-148a-5p a pior prognóstico de câncer gástrico e pancreático (19).

Já descrito em estudos *in vitro* e *in vivo*, o miR-199a-3p parece ter papel supressor tumoral no CPT, pois, quando restaurado, atuou reduzindo os níveis de MET e proteína mTOR, prejudicando a migração e proliferação de células cancerígenas (20). Da mesma forma, o miR-199a-5p foi considerado desregulado tanto no CPT quanto no câncer de tireoide anaplásico (CAT) e fortemente associado à migração celular, invasão e processo epitelial-mesenquimal (EMT) (18). Neste mesmo estudo, o *SNAI1* foi identificado como um possível gene alvo do miR-199a-5p que reforça sua participação na metástase. O *SNAI1* é um grande mediador da invasão e metástase do câncer em diferentes tipos de câncer, uma vez que é responsável pela supressão da E-caderina e pela indução do processo EMT (21).

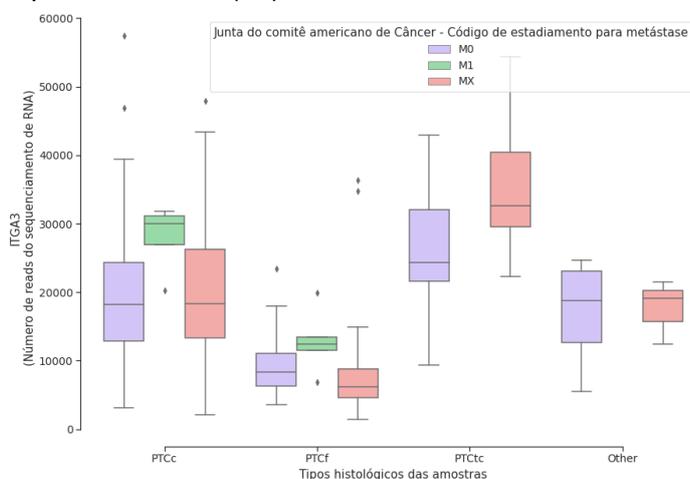


Figura 2: Expressão do *ITGA3* por tipo de tumor e código de estágio de metástase

demonstrar uma expressão mais elevada de *ITGA3* na variante de células altas do CPT e em tumores com metástases à distância, como visto na figura 2. É interessante notar que o CPT de células altas é um tumor com maior incidência de recorrência, metástases nodais e extra nodais e mortalidade associada ao tumor do que outras variantes de CPT (23).

Este resultado parece ser consistente com um estudo prévio que observou a superexpressão do *ITGA3* em CPT com TNM T3-4 quando comparado com T1-2 e com amostras de CPT positivas para BRAF V600E (22). A mutação do BRAF V600E, afeta a via de sinalização intracelular RAS-RAF-MEK que leva a mudanças nos receptores de integrina da membrana celular e na expressão de proteínas de matriz extracelular aumentando o potencial metastático das células tumorais (22).

Diante disso, entretanto, ainda há falta de estudos no CMT ML para provar que os genes em questão também são desregulados. Além disso, há também uma falta de estudos na literatura sobre *SNN* e *FBXO28* no CT; interessante, dados do TCGA demonstraram tendência de co-ocorrência com *ITGA3* ($p < 0,001$, tabela 5).

Os resultados do presente estudo mostram o *ITGA3* como um possível alvo dos miRNAs selecionados. De fato, em um estudo de câncer colorretal, foi demonstrado que o miR-199a-5p é responsável pela regulação da expressão gênica do *ITGA3* (18). O *ITGA3* codifica um membro da família das integrinas, e sua superexpressão está associada à proliferação celular, invasão e migração (22); ao interagir com sua subunidade *ITGB1*, o *ITGA3* medeia a sinalização do EMT envolvendo MAPK e TGF- β , participantes importantes da carcinogênese e progressão da tireoide. Usando dados do TCGA, pudemos

Tabela 5. Tendência de co-ocorrência ou exclusividade mútua

Gene A	Gene B	Nenhum	A não B	B não A	Ambos	\log_2 (Odds Ratio)	p-valor	q-valor	Tendência
<i>ITGA3</i>	<i>SNN</i>	457	16	19	6	>3	<0.001	0.002	Co-ocorrência
<i>SNN</i>	<i>FBXO28</i>	449	22	24	3	1.351	0.147	0.430	Co-ocorrência
<i>ITGA3</i>	<i>FBXO28</i>	451	20	25	2	0.851	0.338	0.430	Co-ocorrência
<i>ITGA3</i>	<i>NECTIN1</i>	453	22	23	0	<-3	0.345	0.430	Exclusividade mútua
<i>NECTIN1</i>	<i>FBXO28</i>	450	21	25	2	0.778	0.358	0.430	Co-ocorrência
<i>NECTIN1</i>	<i>SNN</i>	451	22	24	1	-0.227	0.677	0.667	Exclusividade mútua

Embora esses resultados estejam sujeitos à certas limitações, como a falta de validação destes resultados em uma coorte de pacientes com tumores metastáticos da tireoide, estas descobertas sugerem que, em geral, miR-199a-3p, miR-199a-5p e miR-148a-3p parecem estar correlacionadas com desregulações que levam a EMT e falha na adesão celular.

BIBLIOGRAFIA

- ME C, DG M, C D. Thyroid cancer. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2016 Dec 3 [cited 2021 Aug 13];388(10061):2783–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27240885/>
- Wang LY, Ganly I. Nodal metastases in thyroid cancer: prognostic implications and management. *Futur Oncol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Jul 15];12(7):981. Available from: [/pmc/articles/PMC4992997/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27240885/)
- Hao F, Bi YN, Wang L, Wang Y, Ma J, Cui P, et al. MiR-199a-5p suppresses epithelial-mesenchymal-transition in anaplastic thyroid carcinoma cells via targeting Snail signals. *Cancer Biomarkers* [Internet]. 2020 [cited 2021 Apr 24];29(3):317–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32716347/>
- Siironen P, Hagström J, Mäenpää H, Louhimo J, Arola J, Haglund C. Lymph node metastases and elevated postoperative calcitonin: Predictors of poor survival in medullary thyroid carcinoma. *Acta Oncol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Jul 15];55(3):357–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26339947/>
- Borrelli N, Denaro M, Ugolini C, Poma AM, Miccoli M, Vitti P, et al. miRNA expression profiling of “noninvasive follicular thyroid neoplasms with papillary-like nuclear features” compared with adenomas and infiltrative follicular variants of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Apr 26];30(1):39–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27586203/>
- Kawagoe K, Wada M, Idichi T, Okada R, Yamada Y, Moriya S, et al. Regulation of aberrantly expressed SERPINH1 by antitumor miR-148a-5p inhibits cancer cell aggressiveness in gastric cancer. *J Hum Genet* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Apr 26];65(8):647–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235846/>
- Niveditha D, Jasoria M, Narayan J, Majumder S, Mukherjee S, Chowdhury R, et al. Common and Unique microRNAs in Multiple Carcinomas Regulate Similar Network of Pathways to Mediate Cancer Progression. *Sci Reports* 2020 101 [Internet]. 2020 Feb 11 [cited 2021 Aug 14];10(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-59142-9>
- Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013;41(Database issue). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193258>
- Minna E, Brich S, Todoerti K, Pilotti S, Collini P, Bonaldi E, et al. Cancer Associated Fibroblasts and Senescent Thyroid Cells in the Invasive Front of Thyroid Carcinoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020;12(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31906302>
- Romeo P, Colombo C, Granata R, Calareso G, Gualeni A V, Dugo M, et al. Circulating miR-375 as a novel prognostic marker for metastatic medullary thyroid cancer patients. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2018;25(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29298817>
- Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. In: *PLoS One* [Internet]. 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0206239>
- Colombo C, Minna E, Gargioli C, Muzza M, Dugo M, De Cecco L, et al. The molecular and gene/miRNA expression profiles of radioiodine resistant papillary thyroid cancer. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Apr 19];39(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33198784/>
- Tarabichi M, Saiselet M, Trésallet C, Hoang C, Larsimont D, Andry G, et al. Revisiting the transcriptional analysis of primary tumours and associated nodal metastases with enhanced biological and statistical controls: Application to thyroid cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2015 May 12 [cited 2021 Apr 19];112(10):1665–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25965298/>
- Jiao X, Sherman BT, Huang da W, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics* [Internet]. 2012;28(13). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22543366>
- Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Ishiguro-Watanabe M, Tanabe M. KEGG: Integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2021 Apr 20];49(D1):D545–51. Available from: <https://www.kegg.jp/>
- Donato J, Frazão R, Elias CF. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin [Internet]. Vol. 54, *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2010 [cited 2021 Apr 20]. p. 591–602. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302010000700002&lng=en&nrm=iso&tng=en
- Liu C, Xing M, Wang L, Zhang K. miR-199a-3p downregulation in thyroid tissues is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Biomed Sci* [Internet]. 2017 Apr 3 [cited 2021 Apr 26];74(2):90–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28367740/>
- Tian L, Chen M, He Q, Yan Q, Zhai C. MicroRNA-199a-5p suppresses cell proliferation, migration and invasion by targeting ITGA3 in colorectal cancer. *Mol Med Rep* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Aug 5];22(3):2307. Available from: [/pmc/articles/PMC7411411/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33198784/)
- Idichi T, Seki N, Kurahara H, Fukuhisa H, Toda H, Shimono M, et al. Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: Impact of passenger strand of pre-miR-148a on gene regulation. *Cancer Sci* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Apr 26];109(6):2013–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29660218/>
- Minna E, Romeo P, Cecco L De, Dugo M, Cassinelli G, Pilotti S, et al. miR-199a-3p displays tumor suppressor functions in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 5];5(9):2513. Available from: [/pmc/articles/PMC4058023/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25965298/)
- Kühnöl C, Würfel C, Staegle M, Kramm C. Snail homolog 1 is involved in epithelial-mesenchymal transition-like processes in human glioblastoma cells. *Oncol Lett* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Aug 5];13(5):3882–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28529599/>
- Chernaya G, Mikhno N, Khabalova T, Svyatchenko S, Mostovich L, Shevchenko S, et al. The expression profile of integrin receptors and osteopontin in thyroid malignancies varies depending on the tumor progression rate and presence of BRAF V600E mutation. *Surg Oncol* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Apr 23];27(4):702–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30449496/>
- Okuyucu K, Alagoz E, Ince S, Arslan N. Assessment of risk factors in metastatic/recurrent tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Endokrynol Pol* [Internet]. 2017 Nov 30 [cited 2021 Jul 16];68(6):623–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29022644/>