

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO microRNA miR-600 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO

Palavras-Chave: miR-600, câncer de cabeça e pescoço, risco, prognóstico

Autores:

Felipe Rafael Alves Sandri - Universidade Paulista (UNIP)

Ma. Juliana Carron (coorientadora) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Gustavo J. Lourenço (orientador) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

INTRODUÇÃO:

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) é o termo utilizado para descrever tumores malignos identificados na cavidade oral, faringe, fossa nasal, seios paranasais, e laringe¹. Atualmente, o CCECP representa a oitava neoplasia mais comum em todo o mundo com cerca de 835 mil novos casos identificados anualmente no mundo todo². O CCECP pode ser classificado de acordo com o grau de diferenciação celular, sendo eles: pouco diferenciado ou indiferenciado (grau III), moderadamente diferenciado (grau II), e bem diferenciado (grau I)³. O tratamento para os pacientes com CCECP depende do estágio do tumor⁴. Em estágios iniciais, o tratamento consiste na remoção cirúrgica concomitante ou não com a radioterapia, e em estágios avançados o tratamento é multimodal com remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia⁴.

A causa do desenvolvimento do CCECP é multifatorial, sendo que os principais fatores de risco são o consumo prolongado de álcool e tabaco⁵. Os carcinógenos químicos presentes no tabaco e no álcool induzem o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que resultam em danos oxidativos do DNA de células epiteliais⁶. A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) também é um fator de risco relevante para o CCECP⁷. O HPV insere seu DNA nas células epiteliais, integrando-se ao genoma da célula, levando a inativação ou a mutações de proteínas supressoras de tumor, como a p53, proteína responsável pelo reparo DNA e apoptose⁸. Além disso, a perda ou a aquisição de funções de moléculas reguladoras de ciclo celular, de reparo do DNA, da apoptose e da angiogênese são responsáveis pela ocorrência e agressividade do CCECP⁹. Esses mecanismos podem ser regulados pela ação de RNAs não codificantes, entre eles, os microRNAs (miRNAs) representam a sua maior parte e são os mais estudados em câncer, incluindo o CCECP¹⁰.

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes de 18 a 25 nucleotídeos e sua função é regular negativamente a expressão gênica pós-transcricional pela sua ligação especialmente na região 3' não traduzida (3'-UTR) do RNA mensageiro (RNAm) alvo¹¹. Como consequência dessa ligação, ocorre a redução ou até a inibição completa da expressão do gene alvo¹¹. Os miRNAs atuam na regulação de diversos genes, evidenciando a existência de uma rede de miRNAs controladores de

processos fisiológicos capazes de influenciar a carcinogênese¹². Entre eles, a expressão desregulada do miR-600 foi identificada em câncer de mama¹³, colorretal¹⁴, cervical¹⁵, leucemia mielóide aguda¹⁶, pulmão¹⁷, e próstata¹⁸, no entanto, o papel do miR-600 no desenvolvimento e na progressão do CCECP ainda é desconhecido. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar a influência do miR-600 no risco, nas manifestações clínico-patológicas e no prognóstico de pacientes com CCECP.

METODOLOGIA:

Foram avaliados 49 pacientes com CCECP atendidos por ocasião do diagnóstico ou seguimento clínico no ambulatório de Oncologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP e 44 controles constituídos por doadores de sangue do HEMOCENTRO da UNICAMP.

O RNA total foi obtido de amostras de sangue periférico dos participantes por meio do reagente Trizol. A concentração e o grau de pureza das amostras foram determinados por meio do espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 (NanoDrop Technologies, EUA) e por meio de eletroforese em gel de agarose. As amostras de RNA foram submetidas à síntese de cDNA para os miRNAs miR-600 e RNU24 (utilizado como controle endógeno) com o conjunto de reagentes do kit TaqMan e iniciadores específicos (números dos ensaios: 001556 e 001001, respectivamente, Life Technologies®, EUA). A determinação da expressão do miR-600 foi realizada por meio da PCR quantitativa (qPCR), utilizando os ensaios TaqMan em triplicata e controles negativos, com água estéril em substituição ao cDNA, também foram utilizados. Os resultados da expressão do miR-600 foram calculados por meio da média das expressões de cada amostra e pela aplicação da fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹⁹.

As diferenças entre os grupos foram calculadas por meio do teste de qui-quadrado. Para as análises de expressão do miR-600, os valores apresentaram distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk e foram analisados por meio do teste *t* de Student. A determinação do risco de ocorrência do CCECP foi calculada pela regressão logística múltipla, em que foi obtido as razões das chances (ORs) e o intervalo de confiança (IC) de 95% ajustadas pela idade e pelo hábito de tabagismo.

A sobrevida livre de evento (SLE) foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data da primeira progressão ou recidiva da doença, ou óbito determinado pela doença ou perda de segmento. A sobrevida global (SG) foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data do óbito por qualquer causa ou perda de segmento. Os tempos de SLE e SG foram estimados por meio da curva de Kaplan-Meier (KM) e a comparação entre as curvas foi realizada por meio do teste de log-rank. Não foi possível obter dados consistentes da sobrevida de um paciente.

Resultados com valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico SPSS 21.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O grupo controle foi mais jovem que os pacientes de CCECP e o uso de tabaco foi maior entre os pacientes do que entre os controles. Os controles foram pareados aos pacientes com CCECP por sexo e cor da pele (**Tabela 1**). As diferenças entre a idade e o hábito de tabagismo entre os grupos

foram ajustadas em todas as comparações estatísticas. A maioria dos nossos pacientes apresentou tumor locoregional avançado (n= 26; 53,1%) e bem ou moderadamente diferenciado (n= 34; 69,4%). Os tumores estavam localizados principalmente na região da faringe (n= 24; 49,0%), seguido da laringe (n= 14; 28,6) e da cavidade oral (n= 11; 22,4%).

Observamos que os pacientes com CCECP apresentaram maiores níveis de expressão do miR-600 quando comparados aos controles (0,42 UAs \pm 0,94 desvio padrão (DP) vs 0,05 UAs \pm 0,16 DP; $P= 0,01$) (**Figura 1**). Indivíduos com hiperexpressão do miR-600 (níveis de expressão acima de 0,02 unidades arbitrárias (UA)) estiveram sob risco 6,96 vezes maior de desenvolver o CCECP do que aqueles com hipoexpressão (níveis abaixo ou igual a 0,02 UA) (IC 95%: 1,61-29,98; $P= 0,009$). Os níveis de expressão do miR-600 não influenciaram as manifestações clínico-patológicas dos pacientes.

Em câncer de próstata, a hiperexpressão do miR-600 também foi associada a ocorrência do tumor¹⁸, corroborando com os nossos resultados. Por outro lado, a hipoexpressão do miR-600 foi encontrada em tumores de mama¹³, pulmão¹⁷, colorretal¹⁴, e em células de leucemia mieloide aguda¹⁶. Em câncer de mama, foi observado que a hiperexpressão do miR-600 atua como supressor tumoral em células tronco do tumor uma vez que é capaz de inibir a transcrição do gene *SCDI*, importante na produção de proteínas WNT, responsáveis pela autorrenovação e expansão das células do câncer de mama¹³. Em células de leucemia mieloide aguda, a hiperexpressão do miR-600 foi capaz de silenciar o gene *WT1* e assim, inibir a proliferação celular e induzir a apoptose¹⁶. Em câncer de pulmão, o miR-600 atuou como regulador negativo do gene *METTL-3*, envolvido na proliferação e invasão celular¹⁷.

Os tempos de SLE e SG dos pacientes com CCECP não foram influenciados pela expressão do miR-600 em nosso estudo (**Figura 2**).

Em câncer colorretal, a hiperexpressão do miR-600 foi capaz de diminuir a proliferação e a migração de células com mutações no gene *TP53* e, além disso, permitiu a expressão de proteínas de junção e adesão celular, como a β -catenina e a e-caderina, inibindo a invasão celular e a metástase¹⁴, indicativos de melhor prognóstico. Em câncer cervical, a hiperexpressão do miR-600 foi associada ao melhor prognóstico dos pacientes por permitir a ativação da via *AMPK*, importante na inativação da via mTOR, envolvida na sobrevivência das células tumorais¹⁵. Por outro lado, a hiperexpressão do miR-600 em pacientes com câncer de próstata foi associada ao aumento da invasão linfática, facilitando a metástase, e assim, ao pior prognóstico¹⁸. O miR-600 parece atuar de forma tecido específico, o que explica os diferentes resultados encontrados na literatura e em nosso estudo.

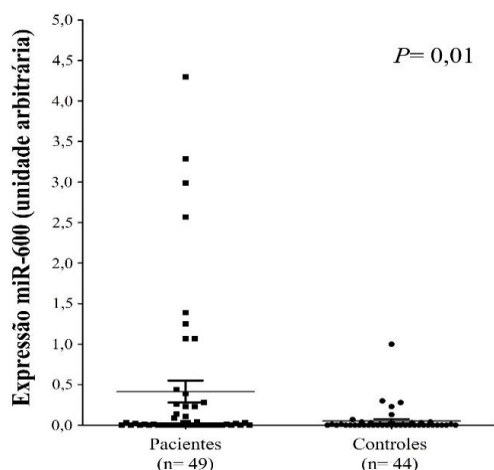


Figura 1. Expressão do microRNA miR-600 em amostras de leucócitos de sangue periférico de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e de indivíduos controles. A expressão do miR-600 foi maior nos pacientes do que nos indivíduos controles (0,42 unidades arbitrárias (UAs) \pm 0,94 desvio padrão (DP) vs 0,05 UAs \pm 0,16 DP; $P= 0,01$)

Tabela 1. Frequências das distribuições dos 49 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e dos 44 controles de acordo com a idade, o sexo, a cor da pele, o hábito de fumar, de ingerir bebidas alcoólicas, e a expressão do microRNA miR-600

Características	Pacientes n (%)	Controles n (%)	Valor de P
Idade			
≤ 52 anos	17 (34,7)	30 (68,2)	0,002
> 52 anos	32 (65,3)	14 (31,8)	
Sexo			
Masculino	42 (85,7)	38 (86,4)	1,00
Feminino	7 (14,3)	6 (13,6)	
Cor da pele			
Branca	36 (73,5)	34 (77,3)	0,81
Preta ou parda	13 (26,5)	10 (22,7)	
Hábito de fumar			
Fumante ou ex fumante	43 (87,8)	30 (68,2)	0,02
Não fumante	6 (12,2)	14 (31,8)	
Etilismo			
Etilista ou ex etilista	39 (79,6)	37 (84,1)	0,60
Não etilista	10 (20,4)	7 (15,9)	
Expressão miR-600			
Hipoexpressão (≤ 0,02 UA)	37 (75,5)	41 (93,2)	0,02
Hiperexpressão (> 0,02 UA)	12 (24,5)	3 (6,8)	

(n) número de indivíduos, (UA) unidades arbitrárias

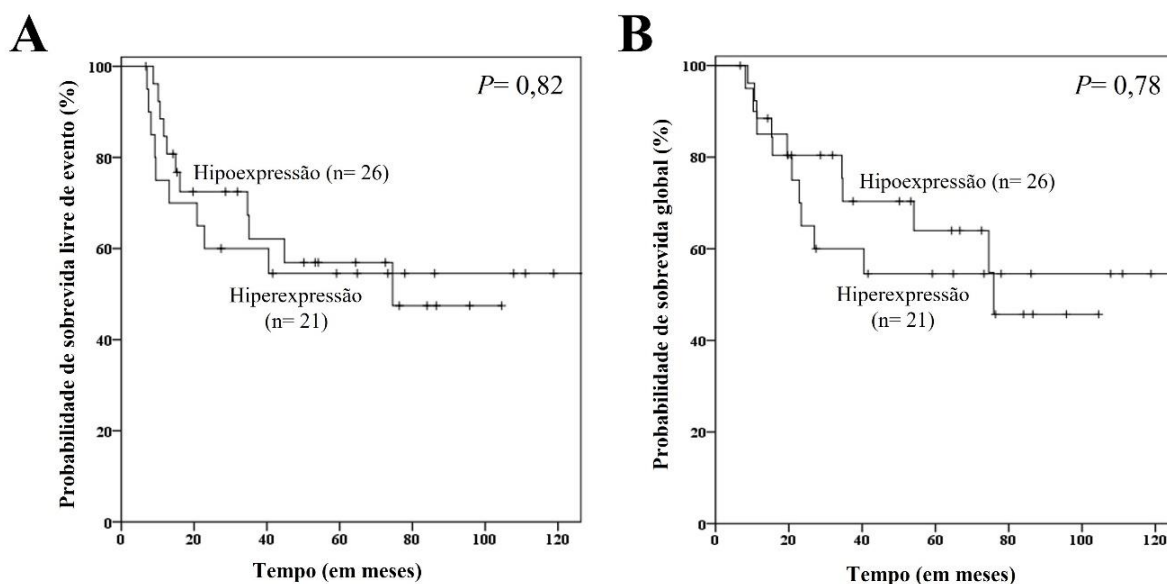


Figura 2. Representação gráfica de curvas de Kaplan-Meier dos pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Os níveis de expressão do miR-600 não influenciaram a sobrevida livre de evento (A) e a sobrevida global (B) dos pacientes. Níveis de expressão do miR-600 menores ou iguais a 0,02 unidades arbitrárias (UA) foram considerados como hipoexpressão e níveis acima de 0,02 UA foram considerados como hiperexpressão do miR-600

CONCLUSÕES:

Nossos resultados sugerem, pela primeira vez, que a hiperexpressão do miR-600 pode influenciar a ocorrência do CCECP. Esse resultado, uma vez validado em amostras com maior número de pacientes e por meio de estudos funcionais, auxiliarão na compreensão dos mecanismos moleculares do CCECP.

BIBLIOGRAFIA

1. Mendenhall MM, Werning JW, Pfister DG. Treatment of head and neck cancers. In: De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p.729-80.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
3. Gale N, Zidar N. Tumours of the head and neck. In: Damjanov I, Fan F. *Cancer grading manual*. 2 ed. Heidelberg New York Dordrecht London: Springer; 2013. p.9-29.
4. Belcher R, Hayes K, Fedewa S, et al. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol*. 2014;110(5):551-74.
5. Shingler E, Robles L A, Perry R, et al. Tobacco and alcohol cessation or reduction interventions in people with oral dysplasia and head and neck cancer: systematic review protocol. *Syst Rev*. 2017;10;6(1):161.
6. Ziech D, Franco R, Pappa A, et al. Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res*. 2011;3;711(1-2):167-73.
7. Dayyani F, Etzel C J, Liu M, Ho CH, Lippman S M, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*. 2010;29;2:15.
8. Psyrri A, Cohen E. Oropharyngeal cancer: clinical implications of the HPV connection. *Ann Oncol*. 2011;22(5):997-999.
9. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22.
10. Castilho R M, Squarize C H, Almeida L O. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci*. 2017;12;18(7):1506.
11. Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;23;116(2):281-97.
12. Ali Syeda Z, Langden S S S, Munkhzul C, et al. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;3;21(5):1723.
13. El Helou R, Pinna G, Cabaud O, et al. miR-600 Acts as a Bimodal Switch that Regulates Breast Cancer Stem Cell Fate through WNT Signaling. *Cell Rep*. 2017;28;18(9):2256-2268.
14. Zhang P, Zuo Z, Wu A, et al. miR-600 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting p53 in mutant p53-expressing human colorectal cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2017;13(3):1789-1796.
15. Zeng Y, Wang KX, Xu H, et al. Integrative miRNA analysis identifies hsa-miR-3154, hsa-miR-7-3, and hsa-miR-600 as potential prognostic biomarker for cervical cancer. *J Cell Biochem*. 2018;119(2):1558-1566.
16. Li H, Xing C, Zhou B, et al. A regulatory circuitry between miR-193a/miR-600 and WT1 enhances leukemogenesis in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2018;61:59-68.e5.
17. Wei W, Huo B, Shi X. miR-600 inhibits lung cancer via downregulating the expression of METTL3. *Cancer Manag Res*. 2019;1;11:1177-1187.
18. Valera VA, Parra-Medina R, Walter BA, Pinto P, Merino MJ. microRNA Expression Profiling in Young Prostate Cancer Patients. *J Cancer*. 2020;11(14):4106-4114.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.